DIE BESTIMMUNG VON GLYKOSYLIERTEN HÄMOGLOBINEN IN ASSERVIERTEN BLUTPROBEN UND IHRE ANWENDUNGSMÖGLICHKEITEN IN DER RECHTSMEDIZIN

Ottmar Kögler

Diss
München
1986

Aus dem Institut für Rechtsmedizin der Universität München

Direktor: Prof.Dr.med.Wolfgang Spann

DIE BESTIMMUNG VON GLYKOSYLIERTEN HÄMOGLOBINEN IN ASSERVIERTEN BLUTPROBEN UND IHRE ANWENDUNGSMÖGLICHKEITEN IN DER RECHTSMEDIZIN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Ottmar Kögler
aus
Riedenburg

Jahr
1985

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. E. Liebhardt

Mitberichterstatter: Prof. Dr. W. Spann

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 13. Feb. 1986

Meinen lieben Eltern

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

A. Einleitung

Problemstellung und Zielsetzung

B. Glykosylierte Hämoglobine - Allgemeine Grundbegriffe und medizinisch-klinische Bedeutung

1. Zur Geschichte der "glykosylierten Hämoglobine"
2. Schnell wandernde glykosylierte Hämoglobine
2.1. Beschreibung der Hämoglobinfraktionen
2.2. Beschreibung der Glykosylierung
2.3. Bedeutung der stabilen und labilen Glykohämoglobinform
3. Stellenwert der Glykosylierung für die Langzeitkontrolle von Diabetikern
4. Retrospektive Aussagefähigkeit der Glykohämoglobine
5. Wertung der Gesamt-Hämoglobine (HbA_1) und der Einzelfraktion HbA_{1c}

C. Methode und Material

1. Methodenvergleich und Methodenwahl
1.1. Agarose - Elektrophorese - System
1.2. Hochdruckflüssigkeits - Chromatographie (HPLC)
1.3. Makrosäulenchromatographie
1.4. Spektroskopisches Verfahren nach Perutz
1.5. Thiobarbitursäure - Methode nach Flückiger und Winterhalter
1.6. Radioimmunologische Bestimmung
1.7. Mikrosäulen - Chromatographie mit Entfernung des labilen Anteils mittels Dialyse, pH-Shift oder eines spezifischen Aldimin-Eliminators

2. Beschreibung der Standard-Durchführung des Isolab-Tests (Panchem^{R}) für schnell wandernde Hämoglobine (HbA_1) mit Aldimin-Eliminator
2.1. Bestandteile des Tests und Probenvorbereitung
2.2. Genaue Anleitung zur Versuchsdurchführung
2.2.1. Berücksichtigung der Temperaturabhängigkeit
2.2.2. Vorgehen bei Verdacht auf Hyperlipidämie
2.2.3. Vorgehen bei lagerungsbedingten Veränderungen der Reagenzien
2.2.4. Versuchsdurchführung
2.2.5. Berechnung der Ergebnisse
2.3. Berücksichtigung von Störfaktoren, die zu falsch hohen oder falsch niedrigen Werten führen
2.4. Verwendung des Cocktail X als Aldimin-Eliminator
2.4.1. Keine Veränderung des Absorptionsspektrums von Hämoglobin und der säulenchromatographischen Auftrennung von HbA_1
2.4.2. Nachweis der Wirkung des Eliminators an der Aldiminfraktion

D. Ergebnisse

1. Teilnahme am Ringversuch im Oktober 1981
2. Anwendbarkeit der Mikrosäulenmethode auch ohne EDTA bei Homogenisieren der Vollblutproben
2.1. Versuche mit Vollblut - nicht homogenisiert, nicht vorbehandelt
2.2. Untersuchungen an homogenisierten Vollblutproben im Vergleich mit EDTA-Blut
3. Anwendbarkeit der modifizierten Mikrosäulenmethode auch bei Diabetikern mit erhöhten Blut-Glukose-Spiegeln

4. Konstanz der HbA_1-Werte bei bis zu zwei Wochen gelagerten Blutproben (als Vollblut)
5. Keine Abhängigkeit der HbA_1-Werte bei Vollblut-ten mit erhöhter Blutalkoholkonzentration (=BAK)
6. Keine Abhängigkeit der HbA_1-Werte in Vollblut-proben mit erhöhter Blutalkoholkonzentration (=BAK) bei Diabetikern

E. Diskussion

1. Probleme der nachträglichen Blutzuckerbestim-mung
2. Bedeutung der modifizierten Mikrosäulenmethode für die Aussage über die Stoffwechsellage bei Diabetikern
3. Rolle der labilen Aldiminform für aktuelle Blut-zucker-Schwankungen
4. Hypoglykämie und HbA_1-Bestimmung
5. Blutzucker- und HbA_1-Bestimmung aus gelagerten Blutproben
6. HbA_1-Bestimmung und Alkohol

F. Zusammenfassung

G. Literatur

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554610_0068

A. Einleitung: Problemstellung und Zielsetzung

Die Frage der allgemeinen Verkehrstüchtigkeit, Fahrsicherheit und der Schuldfähigkeit aufgrund von hyper- oder hypoglykämischen Zuständen spielt in rechtsmedizinischen Gutachten oft eine zentrale Rolle. Sie läßt sich auch durch Glucosebestimmung in Blutproben nicht mit ausreichender Genauigkeit beantworten. Dabei ist speziell noch zu berücksichtigen, daß eine Blutzuckerbestimmung in behördlich und routinemäßig asservierten Blutproben meist problematisch bzw. unmöglich ist. Weiterhin erfolgt in den Blutproben ohne entsprechende Schutzsubstanzen ein rascher Glucoseabbau, vor allem durch die Erythrozyten, so daß eine nachträgliche Bestimmung meist nicht sinnvoll erscheint. Außerdem gibt die Bestimmung des Blutzuckers immer nur Auskunft über den zum Zeitpunkt der Blutentnahme aktuellen Blutglucosespiegel. Der zum Vorfallszeitpunkt relevante Blutglucosespiegel kann jedoch besonders bei hypoglykämischen Zuständen wegen gegenregulatorischer Mechanismen ganz unterschiedlich gewesen sein.

Es wäre deswegen von Interesse, eine einfache und praktikable Methode zur Hand zu haben, mit deren Hilfe sich längerfristige Aussagen über eine Blutzuckermittellage machen lassen und damit eine Neigung zu Hyper- oder auch Hypoglykämien - z.B. bei schlechter Diabeteseinstellung oder bei Diätfehlern - in den Bereich der Objektivierbarkeit gerückt würde.

In der Klinik ist dazu die Bestimmung der sogenannten glykosylierten (=glykosidierten Hämoglobine (HbA_1) für die Diabeteskontrolle entwickelt worden. Deren Messung ermöglicht eine Verlaufskontrolle der Diabeteseinstellung in vier- bis sechswöchigen Abständen, ohne vom aktuellen Blutzucker beeinflußt zu werden (8). Die glykosylierten Hämoglobine lassen sich mit mehreren verschiedenen Methoden bestimmen.

In dieser Arbeit soll ein kommerziell erhältliches Mikrosäulen-Chromatographie-Verfahren nach in der Rechtsmedizin relevanten Gesichtspunkten modifiziert und dessen Aussagefähigkeit bezüglich einer Bestimmung aus behördlich asservierten Blutproben geprüft werden. Da eine HbA_1-Messung, wie schon erwähnt, häufig erst in längerem Zeitabstand nach der Blutentnahme möglich ist, sollte die Praktikabilität der verwendeten Methode im Hinblick auf den möglichen Einfluß von Lagerungsveränderungen und andere Fehlermöglichkeiten wie etwa eines erhöhten Blutalkoholspiegels überprüft werden.

Besonderer Wert wurde dabei jeweils auf einen Vergleich von Normoglykämikern und Diabetikern gelegt.

B. Glykosylierte Hämoglobine - Allgemeine Grundbegriffe und medizinisch-klinische Bedeutung

1. Zur Geschichte der glykosylierten Hämoglobine (nach Bottermann (8)).

Vor knapp 20 Jahren beobachtete Huisman (46) bei 4 mit Tolbutamid behandelten Diabetikern eine Hämoglobinvermehrung. Er nahm an, daß diese Zunahme durch Tolbutamidmedikation bedingt sei. In-vitro-Versuche mit Tolbutamid, die dieses Phänomen reproduzieren sollten, schlugen jedoch fehl. Unabhängig davon fiel Rhabar 1968 (66) bei zwei Diabetikern ein verändertes Hämoglobin-Verteilungsmuster auf. In weiteren Untersuchungen bei Diabetikern fand er das gleiche abnorme Verteilungsmuster. 1969 konnte er die gefundene Bande identifizieren, die als Hämoglobin A_{1c} oder auch als glykosyliertes Hämoglobin bezeichnet wurde. (67).

Trivelli (92) bestätigte 1971 diesen Befund. Die von Elsa Paulsen (62) geäußerte Vermutung, die HbA_{1c}-Vermehrung bei den von ihr untersuchten diabetischen Kindern und Kindern mit asymptomatischen Hyperglykämien könne genetisch bedingt und eventuell einen spezifischen genetischen Marker für Diabetes darstellen, wurde 1975 von Tattersall (90) durch Zwillingsuntersuchungen entkräftet. Er kam zu dem Schluß, daß HbA_1 weniger ein genetischer Marker sei, sondern mehr die Manifestation des Diabetes anzeige. Diese Annahme konnte von Koenig und Ceramni (50) 1975 durch Untersuchungen an gesunden und genetisch determinierten diabetischen Mäusen bestätigt werden. Sie stellten fest, daß bei Eintritt des Diabetes mit Anstieg der Blutzuckerwerte auch eine langsame Zunahme der glykosylierten Hämoglobine auftrat. Im gleichen Jahr konnte Bunn (14) nachweisen, daß HbA_{1c} ein mit einem Glucosemolekül verbundenes Hämoglobinmolekül ist.

2. Schnell wandernde glykosylierte Hämoglobine

2.1. Beschreibung der Hämoglobinfraktionen

In den letzten Jahren ist nun in diesem Zusammenhang die Bestimmung der sog. schnell wandernden glykosylierten (=glykosidierten, die Bezeichnung wurde früher in der Literatur ebenfalls gebraucht) Hämoglobine mehr und mehr in den Mittelpunkt gerückt. Es besteht die Möglichkeit, mit verschiedenen Methoden eine bestimmte Hämoglobinfraktion - das glykosylierte HbA_1 - zu messen und damit indirekte integrierende Aussagen über die Blutzuckermittellage über einen Zeitraum von vier bis sechs Wochen vor der Blutentnahme zu erhalten (8). Dies soll im einzelnen näher erläutert werden.

Der Globinanteil des Hämoglobin ist heterogen: Er besteht aus vier Polypeptidketten, von denen je 2 identisch sind. Beim Erwachsenen handelt es sich um 2 α-Ketten, die zu 97% mit 2β-Ketten ($=\alpha_2\beta_2 = HbA_1$), zu 2,5% mit 2δ-Ketten ($=\alpha_2\delta_2 = HbF$) verbunden sind (8).

Bei säulenchromatographischer Auftrennung von Hämoglobinlösungen durch die Kationenaustausch-Chromatographie wandert das HbA_1 aufgrund seiner stärker negativen Ladung vor dem Hauptgipfel, der HbA_2 und HbA_0 enthält (8) (57). Daher kommt der Ausdruck "schnell wandernde" oder "fast" Haemoglobinfraktion (Abb.1).

Dabei ist das HbA_1 in sich wiederum inhomogen: Es teilt sich auf in eine Reihe kleiner, schneller wandernder Hämoglobine: HbA_{1a}, HbA_{1b}, HbA_{1c}.

2.2. Beschreibung der Glykosylierung

Bei der Gruppe der A_1-Hämoglobine handelt es sich um Glykoproteine (23), also Varianten des Hämoglobin, die durch Glykosylierung an der

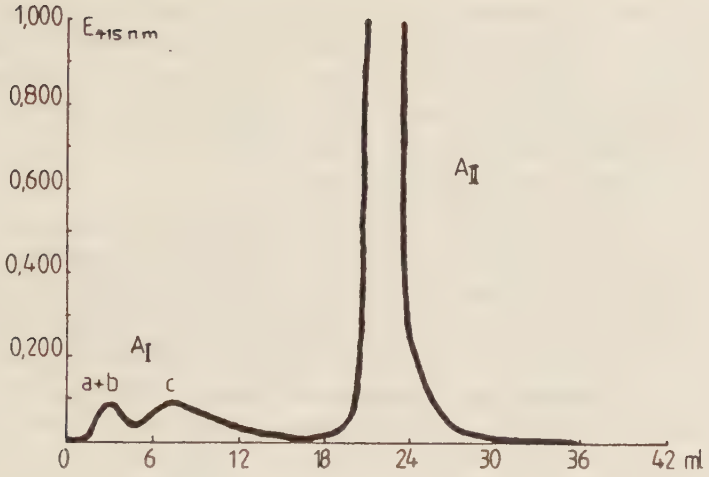


Abb. 1, Chromatografische Auftrennung von Hämoglobin mit Hilfe der Mikrosäulentechnik. Hämoglobin $A_{1a,b,c}$ wird gemeinsam erfaßt und von der Hauptfraktion A_2 getrennt.
aus: Bottermann (8)

β-Kette des Hämoglobins entstehen (85). Beim Diabetiker wurde diese mit Kohlenhydraten verbundene Hämoglobinfraktion erhöht gefunden (66). Die langsame kontinuierliche Reaktionsgeschwindigkeit des Glykosylierungsprozesses ließ an einen nicht-enzymatischen Vorgang denken. Kinetische Studien bewiesen dann auch, daß die Glykosylierung eine nicht enzymatische Kopplung von Kohlenhydraten an die beiden aminoterminalen Valine der β-Ketten des Hämoglobins ist (14,28,72). Diese Reaktion ließ sich sowohl mit Vollblut als auch mit gewaschenen Erythrozyten, Hämolysat und gereinigtem Hämoglobin nachvollziehen, ist also vom Erythrozyten-Stoffwechsel unabhängig (52).

Die Bildung der kleinen Hämoglobinfraktionen erfolgt proportional zur vorliegenden Glucosekonzentration und zur Inkubationsdauer (9,27,51,52). Sie ist ein kontinuierlicher Prozeß, der sehr langsam

während der gesamten Erythrozyten-Überlebensdauer von ca. 120 Tagen abläuft (9,13,85). In neugebildeten, jungen Erythrozyten ist deswegen nur wenig glykosyliertes Hämoglobin nachweisbar. Da die Reaktion irreversibel ist und einmal gebildetes HbA_1 bzw. HbA_{1c} in Erythrozyten akkumuliert, weisen alte Erythrozyten etwa doppelt so viel glykosyliertes Hämoglobin auf als junge (52).

Nicht-enzymatische Glykosylierungsprozesse sind weit verbreitet. Sie sind als "Maillard Reaktion" seit mehr als 60 Jahren bekannt. (3, 10,77). Hierbei kommt es zu einer Kondensierungsreaktion zwischen einer freien Aminosäure oder der Aminosäure eines Polypeptids (Proteins) und der Carbonylgruppe eines Kohlenhydrates. So kommt es nicht nur am Globin zu diesen nicht-enzymatischen Glykosylierungen, sondern auch an anderen Proteinen: an den Membranproteinen der Erythrozyten, an den Apolipoproteinen der Lipoproteine, im Kollagen, Kristallin der Augenlinse und an den Myelinproteinen der Nervenscheide (9,10,16,75,77,81, 82,94,95,96). Bei Diabetikern sind mehrere dieser Blut- und Gewebeproteine höher glykosyliert als bei Normalpersonen (9,10,31,75,78). Deswegen wird auch diskutiert, inwieweit die Glykosylierung für die pathophysiologische Verdickung der Basalmembranen bei Diabetikern als ursächlicher Faktor mit herangezogen werden kann (26,75).

Die Kohlenhydrate als Reaktionspartner der einzelnen Varianten des HbA_1 unterscheiden sich, sind also nicht einheitlich (76,62): Bei einem Teil des HbA_1 - dem HbA_{1a1} - ist es Fructose - 1,6 - diphosphat, beim anderen Teil des HbA_1 - dem HbA_{1a2} - ist es Glucose-6-phosphat und beim HbA_{1c}, der größten Fraktion der glykosylierten Hämoglobine, ist es Glucose (85). Die Struktur von HbA_{1c} wurde 1975 von Bunn (14) aufgeklärt, die des HbA_{1b} ist noch nicht mit genügender Sicherheit bestimmt (25,52). Vermutlich handelt es sich um deamidiertes HbA_{1c} (14).

Anteil	Struktur	Bezeichnung	Anlagerung
97 %	$\alpha_2\beta_2$	HbA_1 (oder HbA oder HbA_0)	
		HbA_1	
		a_1	Fruktose-1,6-Diphosphat
		a_2	Glukose-6-Phosphat
		b	?
		c	Glukose
		HbA_2	
2,5 %	$\alpha_2\delta_2$	HbA_2	
0,5 %	$\alpha_2\gamma_2$	HbF*	

* HbF wird bei chromatographischen Verfahren zus. mit HbA_{1c} erfaßt.

Abb.2: Struktur und Bezeichnung der Hämoglobine des Erwachsenen, aus Bottermann (8)

Die Bindungsstelle der Kohlenhydrate am Hämoglobin ist mit der für organische Phosphate, z.B. das 2,3-Diphosphoglycerat, identisch. 2,3-Diphosphoglycerat sorgt als allosterischer Effektor für die Freisetzung von Sauerstoff aus oxigeniertem Hämoglobin und reguliert damit die Sauerstoffaffinität des Moleküls. Sind die Bindungsstellen durch Kohlenhydrate besetzt, kann der allostericne Effektor nicht wirksam werden, die Sauerstoffaffinität steigt an und die Sauerstoffabgabe im Gewebe ist geringer (15,52). Dies ist nicht nur für eine mögliche schlechtere Sauerstoffversorgung im Gewebe von Diabetikern von Bedeutung, sondern hat darüber hinaus auch zu einem spezifischen Nachweisverfahren für HbA_1 (dem spektroskopischen Verfahren nach Perutz (63) geführt, das später noch genauer erläutert werden soll.

Das Endprodukt des Glykosylierungsprozesses - die Ketoaminform - ist stabil und irreversibel. Zunächst entsteht aber eine instabile, noch reversible Verbindung (Schiffsche Base, Aldimin). Diese labile Aldiminform reagiert auch auf aktuelle Blutzucker-Schwankungen und stört bei Miterfassen die Langzeitkontrolle (10,35,68). Erst durch Amadori-Umlagerung bildet sich dann die stabile Ketoaminbindung des HbA_1 (Abb.3).

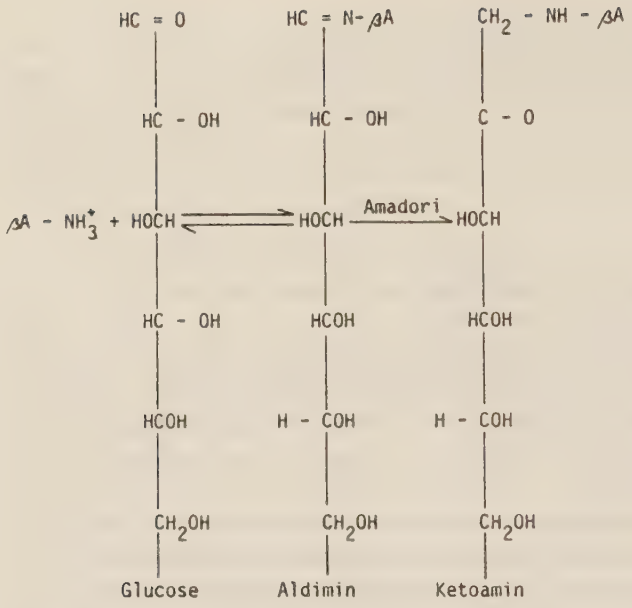


Abb.3: Bildung von HbA_1 durch Anlagerung von Glukose in Form einer Schiff'schen Base am aminoterminalen Ende der β-Kette des Hämoglobins und Umlagerung nach Amadori.

Entsprechend entsteht bei der während der gesamten Erythrozyten-Lebensdauer stattfindenden Anlagerung von Kohlenhydraten an das Hämoglobinmolekül ein zunächst noch reversibles (labiles), später irreversibles (stabiles) Glykohämoglobin (1,9,57,85).

2.3. Bedeutung der stabilen und labilen Glykohämoglobinform

Sowohl bei der Bestimmung der Gesamt-Fraktion der schnell wandernden Hämoglobine ($HbA_{1a,b,c}$) als auch bei der Bestimmung der HbA_{1c}-Fraktion, ist es wichtig, nur die stabile Ketoaminform zu erfassen. Diese wird im Gegensatz zur labilen Aldiminform durch den aktuellen Blutzukker nicht beeinflußt (9,75,85,86).

Nach Laube und Küppers (54) haben Befunde ergeben, daß während eines oralen Glucose-Toleranztestes mit einem Blutzuckeranstieg von etwa 100 mg/dl nach 60 Minuten bereits ein signifikanter Anstieg der labilen Aldimin-Form in Erscheinung getreten sei, während die stabile Ketoaminkomponente davon nicht betroffen gewesen sei.

Bottermann (9) schwächt diese strenge Handhabung, nach der nur die stabile Ketoaminform bestimmt werden soll, wieder etwas ab. Für ihn spiele unter klinischen Gesichtspunkten eine "Verfälschung" der HbA_1-Werte durch den labilen Anteil keine wesentliche Rolle. Größere HbA_1-Schwankungen in Abhängigkeit von der aktuellen Blutzuckerkonzentration würden nach seiner Erfahrung ohnhin nur bei HbA_1-Werten beobachtet, die derart hoch lägen, daß sie in jedem Falle für eine verbesserungswürdige Stoffwechseleinstellung sprächen.

Niederau und Reinauer (57) geben dazu an: Nach ihren Erfahrungen sei in der täglichen Analytik die Aldiminform nur bei Blutzuckerwerten über 3g/l meßbar. In diesen Fällen sei es empfehlenswert, die Aldiminform zu messen und sie als einen retrospektiven Kurzzeitparameter in die klinische Betrachtung mit einzubeziehen. Allerdings sagen sie auch, daß meßbare Erhöhungen des Aldiminanteils auch bei kurzzeitigem Ansteigen der Blutzuckerkonzentration über 3g/l bzw. bei akuten Entgleisungen des Kohlenhydratstoffwechsels zu erwarten seien.

3. Stellenwert der Glykosylierung für die Langzeitkontrolle von Diabetikern

Wie bereits erwähnt, konnte weiterhin bewiesen werden, daß die Menge des gebildeten Glykohämoglobins von der Blutzuckerhöhe abhängig ist (10,27,51). So wurden bei Diabetikern mit erhöhten Blutglucosewerten erhöhte HbA_1-Werte gefunden, vor allem erhöhte HbA_{1c}, geringer auch $HbA_{1a/b}$-Werte (9,10,31,51). Die HbA_1-Werte werden als prozentualer Anteil am Gesamt-Hämoglobin angegeben und betragen bei Gesunden im Mittel 6,5%, davon ca. 1,9% HbA_{1a+b} und ca. 4,6% HbA_{1c}, bei

einer Schwankungsbreite von 5,5% bis 8%. Unter 6,8% ist ein manifester Diabetes mellitus weitgehend auszuschließen, Werte über 8% weisen auf einen Diabetes mellitus hin, eine unbefriedigende Einstellungsqualität liegt bei Werten über 10% vor (5,9,75). Nach Normalisierung der diabetischen Stoffwechsellage ist die Konzentration der glykosylierten Hämoglobine noch über einen längeren Zeitraum erhöht und sinkt entsprechend der Erythrozyten-Überlebensdauer nur sehr langsam wieder ab (51). Deshalb wird die Blutzuckermittellage der zurückliegenden Wochen weitgehend unabhängig vom aktuellen Blutzuckerwert durch die HbA_1 bzw. HbA_{1c}-Konzentration wiedergespiegelt (9).

4. Die retrospektive Aussagefähigkeit der Glykohämoglobine

Der Zeitraum, über den das HbA_1 hinsichtlich der Blutzuckermittellage eine verläßliche Aussage erlaubt, wird heute von verschiedenen Autoren mit vier bis sechs Wochen übereinstimmend angegeben.

Koenig (51) spricht zwar in einer Studie noch von drei Monaten, aber die Zahl der beobachteten Fälle war mit fünf eher gering.

Bottermann (9) hingegen konnte immerhin in 121 Fällen von Diabetes mellitus nachweisen, daß es bei strenger Stoffwechseleinstellung mit weitgehender Normoglykämie innerhalb von vier bis sechs Wochen zu einem langsamen Abfall der HbA_1-Konzentration gekommen sei.

Dies deckt sich auch mit den Aussagen, die Gain (33), Gale (34) und Gabbay (31) über den Zeitraum der retrospektiven Aussagekraft des HbA_1 machen.

5. Wertung der Gesamt-Hämoglobine HbA_1 und der Einzelfraktion HbA_{1c}

Die heute verfügbaren Analyseverfahren erfassen entweder die Gesamtfraktion der schnell wandernden Hämoglobine (HbA_{1a+b+c}) oder aber

die Einzelfraktion des HbA_{1c} (57). Sowohl die Gesamtfraktion als auch die Einzelfraktion HbA_{1c} - sofern die stabile Ketoaminform zugrunde gelegt wird - korrelieren gut mit den über Wochen ermittelten Blutzuckermittelwerten, dem Nüchternblutzucker, dem Mittelwert aus mehreren Blutzucker-Tagesprofilen und der Urinzuckerausscheidung in 24 Stunden (31, 38,39,51,62,92).

Die Normbereiche der glykosylierten Hämoglobine werden zum Teil unterschiedlich angegeben. Dies erschwert die Vergleichbarkeit der erhobenen Daten (57). Von Heinze (40) ist gerade wegen dieser Schwierigkeit 1983 eine einfache Score-Methode entwickelt worden, mit deren Hilfe unabhängig von der Bestimmungsmethode des HbA_{1c} oder HbA_{1a+b+c}, die Ergebnisse miteinander verglichen werden können. Danach lassen sich die HbA_{1c} - oder HbA_{1a+b+c} -Werte in Standardabweichungen (=SD-Einheiten) umrechnen.

Laut Dunn (23) ist es nicht notwendig, die HbA_{1c}-Konzentration alleine zu messen. Denn die HbA_{1c}-Konzentration korreliere erstens eng mit der Summe der Gesamt-HbA_1-Fraktion und zweitens sei die Konzentration von HbA_{1a}+ HbA_{1b} vernachlässigbar gering (HbA_{1a+b} 1,6%; HbA_{1c} 4,8%).

Auch Gabbay (31) hält das Gesamt-HbA_1 für besser geeignet als die Bestimmung der Einzelfraktionen HbA_{1c}.

Abraham et al. (1) geben an, daß die Bestimmung der Gesamt-HbA_1-Werte sich in der klinischen Routine als günstiger erweise, als die des HbA_{1c}.

Unterstützt wird diese Aussage durch Untersuchungen, die von Bolli (7) und Fraser (29) durchgeführt wurden. Sie halten die Gesamt-HbA_1-Messung für praktikabler.

C. Methode und Material

1. Methodenvergleich und Methodenwahl

Zur Bestimmung der glykosylierten Hämoglobinfraktionen standen verschiedene Methoden zur Auswahl, die im folgenden kurz gegenübergestellt werden sollen. Da in unserem Falle eine Methode gesucht wurde, die mit möglichst wenig labortechnischem und personellem Aufwand verläßliche Werte liefert, wird in diesem Vergleich die Entscheidung verdeutlicht.

Die gebräuchlichen Verfahren sind:

1.1. das Agarose-Elektrophorese-System (56)
1.2. die Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)
1.3. die Makrosäulenchromatographie
1.4. das spektroskopische Verfahren nach Perutz et al. (63)
1.5. die Thiobarbitursäuremethode nach Flückiger und Winterhalter (TBA-Methode), eine kolorimetrische Methode (28)
1.6. die Radioimmunologische Bestimmung nach Javid (47)
1.7. die Mikrosäulenchromatographie mit Entfernung des labilen Anteils mittels Dialyse, pH-Shift oder eines speziellen Aldimin-Eliminators.

1.1. Das Agarose-Elektrophorese-System (56)

Die elektrophoretische Trennung erfolgt auf Agarplatten bei einem bestimmten pH-Wert. Das Gel muß anschließend getrocknet werden und kann dann im Densitometer ausgewertet werden. Die Dauer dieser Vorgänge beträgt mindestens eine Stunde.

Hierbei wird die Gesamtfraktion der glykosylierten Hämoglobine von der nicht glykosylierten Fraktion getrennt. In einem Methodenvergleich, der von Niederau (57) durchgeführt worden ist, zeigte die Elektroosmose

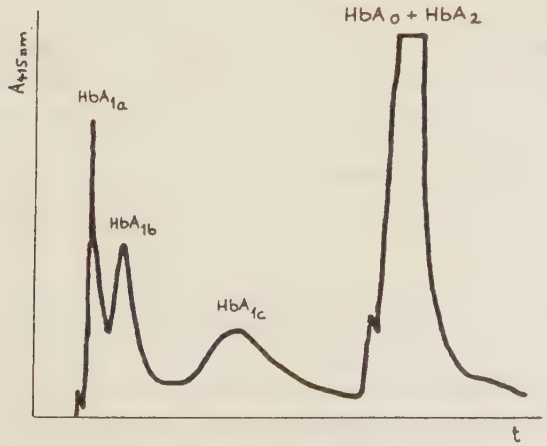
eine gute Korrelation mit den Vergleichsverfahren (r=0,91); die Präzision war mit dem Variationskoeffizienten VK=10,8% (bei n=10) weniger gut.

Da aber dieses Verfahren zu Beginn dieser Arbeit noch nicht auf dem Markt war, und somit wenig Daten vorlagen, schied es für uns aus.

1.2 Die Hochdruckflüssigkeits - Chromatographie (HPLC)

Hierbei findet meist das Bio-Rex 70-System Anwendung (19,20). Dazu existieren bereits verschiedene Kompaktgeräte. mit denen sich die Chromatographie bei einem definierten Säulendruck durchführen läßt. Die Elution erfolgt mittels zweier Puffer und das Eluat kann in einer Durchflußküvette gemessen werden. Mit einem gekoppelten Rechner lassen sich die Elutionsprofile aufzeichnen und die Flächenintegrale prozentual bestimmen. Die Dauer der Analyse einschließlich der Regeneration beträgt eine Stunde.

Die einzelnen Hämoglobinfraktionen werden dabei getrennt erfaßt (Abb.4). Außerdem wird dabei nur die stabile Ketoaminform bestimmt (77).



Abo.4: Hochdruckflüssigkeitschromatographische Auftrennung von Hämoglobin auf Bio-Rex 70, - 200 mesh, Fluß 1,2 ml/min, Druck 20 bar.
aus Niederau (57)

Nach Niederau (57) zeige diese Methode die beste Auftrennung innerhalb eines sehr kurzen Zeitraumes. Die Korrelation mit der Makroläulenmethode liege für das Gesamt-HbA_1 bei r=0,88, für HbA_{1c} bei r=0,87, die Variationskoeffizienten (VK) errechneten sich für HbA_{1a+b}: VK=6,2% (n=10) und für HbA_{1c}: VK=2,8% (n=10).

Da für dieses Verfahren aber eine große labortechnische Einrichtung erforderlich ist, findet es heute lediglich als Referenzmethode im wissenschaftlichen Bereich ihren Einsatz und scheidet als Routineverfahren aus (57,75,85,86).

1.3. Die Makrosäulenchromatographie nach Trivelli (92)

Die Durchführung erfolgt im Grunde hier wie bei der Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie, lediglich bei niedrigeren Drücken, Dadurch steigt die Dauer erheblich an: insgesamt vier Stunden.

Die einzelnen Fraktionen können auch hier wieder getrennt erfaßt werden (Abb.4). Wie bereits erwähnt korrelieren die Hochdruckflüssigkeits-Chromatographien und das Makrosäulenverfahren mit r=0,87 für HbA_{1c} und r=0,88 für Gesamt-HbA_1 sehr gut (57).

Da aber das Makrosäulenverfahren zusätzlich zum labortechnischen und Kostenaufwand noch sehr viel Zeit in Anspruch nimmt, war es für unsere Bedürfnisse wenig geeignet. Wie Niederau (57) empfehlen Schernthaner (75) und Sonnenberg (85) diese Methode für die Routinediagnostik nicht.

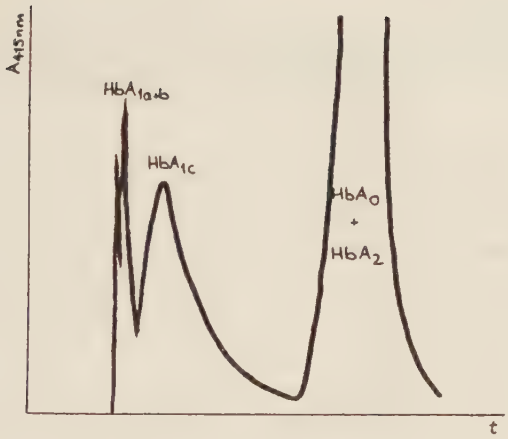


Abb.5: Säulenchromatographische Auftrennung von Hämoglobin nach Trivelli et al. (2).
Puffer 1: 0,042 mol/l Phosphat, pH = 6,74
Puffer 2: 0,150 mol/l Phosphat, pH = 6,42
Säule 0,9 X 20cm, Bio-Rex 70, 200-400 mesh.
aus Niederau (57).

1.4. Das spektroskopische Verfahren nach Perutz (63)

Diese Methode beruht auf Arbeiten von Perutz. Die Bindung von 2,3 Diphosphoglycerat (oder Inosithexaphosphat) an das Hämoglobin, wodurch eine charakteristische Spektralverschiebung zustande kommt, wird durch Glykosylierung des β-endständigen Valin verhindert (Abb.6). Die Reagenzien können selbst angesetzt werden, sind aber auch fertig kommerziell erhältlich.

Das Verfahren ist wenig zeitaufwendig, relativ kostengünstig von den Reagenzienkosten her betrachtet, zeigte aber nach Niederau (57) keine brauchbare Korrelation mit anderen Verfahren: So habe sich ein Korrelationskoeffizient von r=-0,2 mit der Thiobarbitursäure-Methode (TBA) von r=-0,28 mit der Mikrosäulenmethode ergeben. Die Präzision

sei mit dem Variationskoeffizienten VK=1,2% (n=10) gleichwohl sehr gut gewesen.

Die von Niederau beschriebene mangelnde Korrelation mit Vergleichs-methoden hielt uns aber von der Wahl der Methode ab.

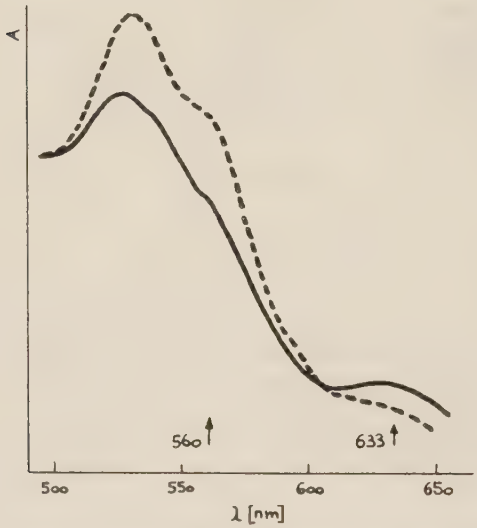


Abb.6: Absorptionsspektrum von Hämoglobin vor (---) und nach (---) Zugabe von Inosithexaphospnat als Grundlage der spektroskopischen Bestimmungsmethode
aus Niederau (57)

1.5. Das kolorimetrische Verfahren nach Flückiger und Winterhalter (28)
- die Thiobarbitursäuremethode (TBA-Methode)

Die kolorimetrische Messung beruht auf folgendem Prinzip: durch Säurehydrolyse wird aus dem Glucoserest des stabilen Ketoamins 5-Hydroxymethylfurfural freigesetzt, das mit Thiobarbitursäure einen gelben Farbkomplex bildet, der fotometrisch gemessen werden kann. Labiles Glykohämoglobin dissoziiert unter den sauren Inkubationsbedingungen und wird mit der TBA-Methode nicht erfaßt. Dabei wird also das HbA_{1c} alleine bestimmt.

Die Dauer beträgt leider auch mehrere Stunden. Außerdem ist die Methode nicht spezifisch für glykosylierte Hämoglobine, sondern erfaßt auch andere glykosylierte Proteine wie z.B. Serumproteine (16, 37).

Aus Arbeiten von Flückiger und Winterhalter (28), sowie von Fischer (25) geht weiter hervor, daß außer dem β-endständigen Valin, das vorrangig für das chromatographische und elektrophoretische Verhalten der schnellen Hämoglobine verantwortlich ist, auch weitere Aminogruppen (ε-Aminogruppen von Lysin)glykosyliert und die abgespaltene Fructose mit der kolorimetrischen Methode erfaßt würden.

Niederau (57) stellt dazu fest, daß deswegen von vorneherein Unterschiede in den Meßdaten zu erwarten seien. Es ergebe sich eine brauchbare Korrelation nur in einem mittleren Konzentrationsbereich zwischen 9-11% HbA_1. Unterhalb dieses Bereiches würden mit der TBA-Methode zu niedrige, oberhalb zu hohe Werte gemessen. Die Korrelation mit der Makrosäulenmethode ist nach Niederau (57) gleichwohl mit r=0,84 gut, ebenso die Präzision, berücksichtigt man dabei die Konzentration der glykosylierten Hämoglobine: VK=3,6% (n=10) für Normbereich des HbA_1, VK=4,2% (n=10) bei 12,2% HbA_1.

Die lange Dauer der Analyse und die Unsicherheit hinsichtlich der Spezifität der Methode ließen uns von der TBA-Methode Abstand nehmen.

1.6. Die Radioimmunologische Bestimmung

Bestimmungen dieser Art, wie sie etwa von Javid (47) beschrieben werden, schieden für unsere Untersuchung von vorneherein aus, da die entsprechenden labortechnischen Ausstattungen nicht zur Verfügung standen.

1.7. Die Mikrosäulen - Chromatographie

Käufliche Mikrosäulen werden heute von verschiedenen Herstellern angeboten. Die Tests beruhen weitgehend auf Arbeiten von Schroeder und Mitarbeitern (2,17), die dann von Autoren wie Abraham (1), Welch (97), Kynoch (53), Bottermann (8), Niederau (57) auf ihre Aussagefähigkeit hin geprüft worden sind.

Die Tests bestehen aus Hämolysereagenz, Aldimineliminator (dieser wird nicht von allen Herstellern angeboten), Elutionslösungen und vorgefüllten Wegwerf-Trennsäulen. Die Säulen können aber auch im Prinzip wiederverwendet werden nach vollständiger Regeneration und Aufbereitung des Harzes.

Die Trennung erfolgt als Ionenaustauschchromatographie mittels des in den Säulen enthaltenen Austauschharzes und der anschliessenden Eluierung. Das Eluat kann photometrisch bestimmt werden.

Durch das standardisierte Mikrosäulenverfahren werden die schnellen Hämoglobine als Summe pauschal erfaßt, die Auftrennungsqualität ist nicht zu beurteilen.

Nach Niederau (57) korreliert das Verfahren mit r=0,97 sehr gut mit dem Makrosäulenverfahren. Die gute Korrelation der Mikrosäulen-Chromatographie mit anderen Methoden wurde auch von verschiedenen anderen Autoren bestätigt (1,54,58,75,86). Bei Einhaltung der Temperatur liefert die stark temperaturabhängige Mikrosäulenmethode laut Niederau (57) ein zuverlässiges Ergebnis über die Glykosylierung der Hämoglobine.

Bottermann/Gain (9) halten die Methode für die klinische Routine, bei der in kurzer Zeit größere Probenzahlen bewältigt werden müssen, für gut geeignet.

Der früher geltende Vorbehalt, daß mit der Mikrosäulenmethode auch der "labile" Anteil des Glykohämoglobin miterfaßt würde, ist inzwischen gegenstandslos, denn es besteht die Möglichkeit, diesen Anteil zu entfernen: Dies kann entweder mittels Dialyse des Hämolysats gegen glucosefreien Puffer über 12-14 Stunden oder mittels

pH-Shift geschehen, wobei die Aldiminform aber auch mit einem spezifischen Eliminator beseitigt oder als zusätzlicher Parameter isoliert werden (57,9).

Die einfache Durchführbarkeit, die sichere und ebenso einfache Möglichkeit der Eliminierung des "labilen" Glykohämoglobins und die gute Korrelation mit wesentlich aufwendigeren Methoden, gaben den Ausschlag dafür, daß die Mikrosäulen-Chromatographie als Methode gewählt wurde.

2. Beschreibung der Standard-Durchführung des Isolab-Tests (Panchem^{R}) für schnell wandernde Hämoglobine mit Aldimin-Eliminator

Das Isolab "Fast Hemoglobin Test System" ist dafür ausgelegt, das Hämolysat von Human-Erythrozyten in zwei chromatographische Fraktionen vor der photospektrometrischen Quantifizierung aufzutrennen. Diese zwei Fraktionen werden als "schnell wanderne" (=HbA_{1a+b+c}) und "langsam wandernde" oder auch "andere" oder "Rest"-Hämoglobine (=HbA_0 + HbA_2) bezeichnet.

2.1. Bestandteile des Tests und Probenvorbereitung

Der Isolab-Test besteht aus dem Aldimin-Eliminator, zwei Elutionsreagenzien zum Auswaschen von $HbA_{1a,b,c}$ einerseits und HbA_0 + HbA_2 andererseits, vorgefüllten Wegwerf-Trennsäulen und einem Hämolysereagenz. Die Durchführung ist in weniger als einer Stunde abgeschlossen. Der Test beruht auf der Methode von Schroeder et al. (2,17,80).

Säulen und Reagenzien sollen unter 30°C, aber nicht im Kühlschrank gelagert werden. Bei richtiger Lagerung haben Säulen und Reagenzien eine Mindest-Laufzeit von vier Monaten. Das Verfallsdatum ist auf jeder Flasche, Säulenbox und dem Packzettel angegeben.

Blutproben, die diesem Test unterworfen werden, sollten frisch abgenommen werden. Ist dies nicht möglich, sollten mit NaF oder EDTA als Antikongulanz beschichtete Sammelröhrchen verwendet werden.

Reagenzien und Säulen sollen vor Testdurchführung auf Raumtemperatur gebracht werden.

2.2. Genaue Anleitung zur Versuchsdurchführung

2.2.1. Berücksichtigung der Temperaturabhängigkeit

Alle an Ionenaustauschern mittels Puffer unterschiedlichen pH-Wertes durchführbaren säulenchromatographischen Trennungen sind bei Verwendung vorgefertigter, auf die jeweilige Ionenstärke des Austauschers eingestellte Elutionslösungen temperaturabhängig. Diese Abhängigkeit tritt gerade bei besonders wenig differenzierten Stoffen, wie eben HbA_0 + HbA_2 und HbA_1 zutage. Da die optimale Temperatur von 23°C bei der Testdurchführung nicht immer eingehalten werden kann, liegt dem Test eine auf ca. 300 Proben basierende Temperatur-Korrekturtafel bei (Tafel 1 als Abb.).

2.2.2. Vorgehen bei Verdacht auf Hyperlipidämie

Nach Douglas, Dix et al. (21) wird über Störungen des Fast Hemoglobin Testes durch erhöhte Lipidkonzentration im Plasma berichtet. Diese Stoffgruppe wird gemeinsam mit den schnell wandernden Hämoglobinen eluiert und verursacht eine Trübung dieser Fraktion. Trübungen stören jede kolorimetrische Absorptionsmessung. In einem solchen Fall muß mit erhöhten Werten gerechnet werden. Falls eine Hyperlipidämie durch Aussehen des Plasmas wahrscheinlich ist, sollte das Hämolysat für den Test aus Erythrozyten und nicht aus Vollblut gewonnen werden. Dazu wird das Blut zentrifugiert und anschließend werden die Erythrozyten mit isotoner Lösung gewaschen. Pro Erythrozyten-Volumen wird 1 Volumenteil Aqua dest. hinzugefügt. Das Endhämolysat wird dadurch gewonnen, daß 50 µl des so erhaltenen Hämolysats mit 200 µl des Aldimin-Eliminators versetzt wird.

Errechnet Raumtemperatur

%Fast	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
1.0	3.3	2.7	2.1	1.7	1.3	1.0	0.7	0.5	0.2	0.0	0.0
1.5	4.0	3.3	2.7	2.3	1.9	1.5	1.2	0.9	0.7	0.4	0.3
2.0	4.7	4.0	3.4	2.8	2.4	2.0	1.7	1.4	1.1	0.8	0.6
2.5	5.5	4.7	4.0	3.4	2.9	2.5	2.1	1.8	1.5	1.2	1.0
3.0	6.2	5.3	4.6	4.0	3.5	3.0	2.6	2.2	1.9	1.6	1.4
3.5	6.9	6.0	5.2	4.6	4.0	3.5	3.1	2.7	2.3	2.0	1.8
4.0	7.7	6.7	5.8	5.1	4.5	4.0	3.5	3.1	2.8	2.4	2.1
4.5	8.4	7.4	6.5	5.7	5.1	4.5	4.0	3.6	3.2	2.8	2.5
5.0	9.1	8.0	7.1	6.3	5.6	5.0	4.5	4.0	3.6	3.2	2.9
5.5	9.9	8.7	7.7	6.9	6.1	5.5	4.9	4.5	4.0	3.6	3.3
6.0	10.6	9.4	8.3	7.4	6.7	6.0	5.4	4.9	4.4	4.0	3.7
6.5	11.3	10.0	8.9	8.0	7.2	6.5	5.9	5.3	4.9	4.4	4.0
7.0	12.1	10.7	9.6	8.6	7.7	7.0	6.4	5.8	5.3	4.8	4.4
7.5	12.8	11.4	10.2	9.2	8.3	7.5	6.8	6.2	5.7	5.2	4.8
8.0	13.5	12.0	10.8	9.7	8.8	8.0	7.3	6.7	6.1	5.6	5.2
8.5	14.3	12.7	11.4	10.3	9.3	8.5	7.8	7.1	6.5	6.0	5.5
9.0	15.0	13.4	12.0	10.9	9.9	9.0	8.2	7.6	6.9	6.4	5.9
9.5	15.7	14.1	12.7	11.4	10.4	9.5	8.7	8.0	7.4	6.8	6.3
10.0	16.4	14.7	13.3	12.0	10.9	10.0	9.2	8.4	7.8	7.2	6.7
10.5	17.2	15.4	13.9	12.6	11.5	10.5	9.6	8.9	8.2	7.6	7.1
11.0	17.9	16.1	14.5	13.2	12.0	11.0	10.1	9.3	8.6	8.0	7.4
11.5	18.6	16.7	15.1	13.7	12.6	11.5	10.6	9.8	9.0	8.4	7.8
12.0	19.4	17.4	15.7	14.3	13.1	12.0	11.1	10.2	9.5	8.8	8.2
12.5	20.1	18.1	16.4	14.9	13.6	12.5	11.5	10.7	9.9	9.2	8.6
13.0	20.8	18.8	17.0	15.5	14.2	13.0	12.0	11.1	10.3	9.6	8.9
13.5	21.6	19.4	17.6	16.0	14.7	13.5	12.5	11.5	10.7	10.0	9.3
14.0	22.3	20.1	18.2	16.6	15.2	14.0	12.9	12.0	11.1	10.4	9.7
14.5	23.0	20.8	18.8	17.2	15.8	14.5	13.4	12.4	11.6	10.8	10.1
15.0	23.8	21.4	19.5	17.8	16.3	15.0	13.9	12.9	12.0	11.2	10.5
15.5	24.5	22.1	20.1	18.3	16.8	15.5	14.3	13.3	12.4	11.6	10.8
16.0	25.2	22.8	20.7	18.9	17.4	16.0	14.8	13.8	12.8	12.0	11.2
16.5	26.0	23.4	21.3	19.5	17.9	16.5	15.3	14.2	13.2	12.4	11.6
17.0	26.7	24.1	21.9	20.1	18.4	17.0	15.7	14.6	13.7	12.8	12.0
17.5	27.4	24.8	22.6	20.6	19.0	17.5	16.2	15.1	14.1	13.2	12.3
18.0	28.2	25.5	23.2	21.2	19.5	18.0	16.7	15.5	14.5	13.6	12.7
18.5	28.9	26.1	23.8	21.8	20.0	18.5	17.2	16.0	14.9	14.0	13.1
19.0	29.6	26.8	24.4	22.3	20.6	19.0	17.6	16.4	15.3	14.4	13.5
19.5	30.4	27.5	25.0	22.9	21.1	19.5	18.1	16.9	15.8	14.8	13.9
20.0	31.1	28.1	25.6	23.5	21.6	20.0	18.6	17.3	16.2	15.2	14.2
20.5	31.8	28.8	26.3	24.1	22.2	20.5	19.0	17.7	16.6	15.5	14.6
21.0	32.6	29.5	26.9	24.6	22.7	21.0	19.5	18.2	17.0	15.9	15.0
21.5	33.3	30.1	27.5	25.2	23.2	21.5	20.0	18.6	17.4	16.3	15.4
22.0	34.0	30.8	28.1	25.8	23.8	22.0	20.4	19.1	17.8	16.7	15.7
22.5	34.7	31.5	28.7	26.4	24.3	22.5	20.9	19.5	18.3	17.1	16.1
23.0	35.5	32.2	29.4	26.9	24.8	23.0	21.4	20.0	18.7	17.5	16.5
23.5	36.2	32.8	30.0	27.5	25.4	23.5	21.9	20.4	19.1	17.9	16.9
24.0	36.9	33.5	30.6	28.1	25.9	24.0	22.3	20.8	19.5	18.3	17.2
24.5	37.7	34.2	31.2	28.7	26.4	24.5	22.8	21.3	19.9	18.7	17.6
25.0	38.4	34.8	31.8	29.2	27.0	25.0	23.3	21.7	20.5	19.1	18.0
25.5	39.1	35.5	32.5	29.8	27.5	25.5	23.7	22.2	20.8	19.5	18.4
26.0	39.9	36.2	33.1	30.4	28.0	26.0	24.2	22.6	21.2	19.9	18.8
26.5	40.6	36.9	33.7	31.0	28.6	26.5	24.7	23.1	21.6	20.3	19.1
27.0	41.3	37.5	34.3	31.5	29.1	27.0	25.1	23.5	22.0	20.7	19.5
27.5	42.1	38.2	34.9	32.1	29.6	27.5	25.6	23.9	22.5	21.1	19.9
28.0	42.8	38.9	35.6	32.7	30.2	28.0	26.1	24.4	22.9	21.5	20.3

Tafel 1: Temperaturkorrektur - Tabelle

2.2.3. Vorgehen bei lagerungsbedingten Störungen der Reagenzien

Bei zu langer Lagerung in gleicher Position, könnte die Packung der Säulen zu fest sein, was die Flowrate beeinträchtigt. In diesem Falle werden die verschlossenen Säulen auf den Kopf gestellt, bis der Austauscher sich abgesetzt hat. Anschließend muß die Säule 30 Minuten in Arbeitsposition stehen.

Während des Versandes kann Luft in die Säulen gelangt sein. Einige kleine Luftbläschen stören die Durchführung nicht. Größeres Luftvolumen wird durch Aufrichten der oberen Membran herausgelassen. Die Membran wird anschließend wieder in die alte Position gebracht und mit einer umgekehrten Pasteurpipette bis an das Säulenbett, ohne dies zu komprimieren, geschoben.

2.2.4. Versuchsdurchführung (Abb.7)

Zu Beginn des Versuches muß die Raumtemperatur gemessen und festgehalten werden, und auch während des Tests sollte sie überprüft werden. Ebenso sollte die Lagerungstemperatur der Reagenzien bekannt sein.

1) Die Säulenkappe wird als erstes entfernt, erst dann der untere Verschluß. Diese Reihenfolge ist wichtig, um Luftblasenbildung zu vermeiden. Die Säule kann jetzt ablaufen bis zur oberen Membrane. Ist die Flowrate befriedigend (Tropfrate: 3/Minute) wird die obere Membran bis an das Säulenbett herabgedrückt.

2) Ca. 50 µl Blut werden mit 200 µl Eliminator (der bei Blutzucker-Werten unter 500 mg/dl je nach Testansatz des Herstellers verdünnt, bei Blutzucker-Werten über 500 mg/dl unverdünnt angewendet wird) gemischt, und zehn Minuten unter gelegentlichem Schütteln stehengelassen.

3) 50 µl des Hämolysats werden in die Säule gegeben. Die Säulen laufen ab, bis der obere Filter den Auslauf stoppt.

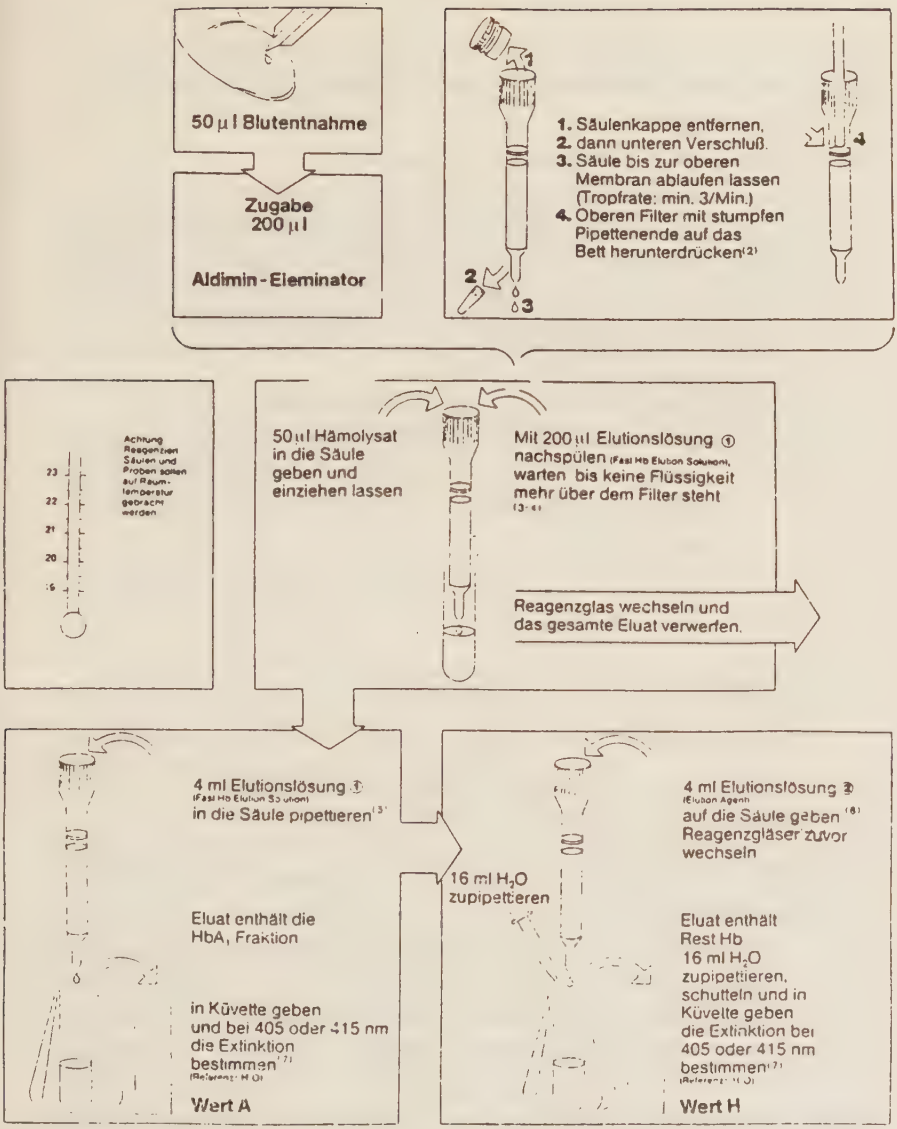


Abb. 7: Versuchsdurchführung

4) Die Wandung der Säule wird mit 200 µl der Fast Hb Elution (Elution 1) genetzt und es wird gewartet, bis der Filter den Ablauf stoppt; das Eluat wird verworfen.

5) Elution der schnell wandernden HbA_1-Fraktion.
Ein sauberes Sammelröhrchen wird unter die Säule gesetzt und vier ml der Lösung 1 auf die Säule gegeben. Das gesamte Volumen bis zum automatischen Flowstop durch den oberen Filter wird gesammelt. Das Sammeln sollte weniger als 30 Minuten dauern. Die Lösung darf nicht vor Analyse mit dem Photospektrometer verdünnt werden.

6) Elution der anderen Hämoglobin-Fraktion.
Ein neues Auffangröhrchen wird unter die Säule gegeben und vier ml von der Lösung 2 (="other hemoglobin"-Elution) auf die Säule gegeben. Wieder wird abgelaufen lassen bis zum automatischen Stop. Diese Fraktion "Andere Hämoglobine" sollte vor der Messung mit 16 ml aqua destillata verdünnt werden.

7) Die Absorption in OD-Einheiten wird von beiden Fraktionen bei 415 nm ermittelt. Als Leerwert dient H_2O.

2.2.5. Berechnung

A = Absorption der "schnell wandernden Hb-Fraktion"
H = Absorption der "anderen Hb-Fraktion".

Die Konzentration der schnell wandernden HbA_{1a+b+c}-Fraktion errechnet sich dann in Prozent:

$$\% \text{ schnell wandernde Hb-Fraktion} = \frac{A}{A + 5\,H} \times 100\ \%$$

Bei Abweichen der Test-Temperatur von 23°C erfolgt noch die Korrektur des errechneten Wertes mittels Korrekturtabelle.

2.3. Berücksichtigung von Störfaktoren, die zu falsch hohen oder falsch niedrigen Werten führen

Zu falsch hohen Werten kommt es bei HbF-Vermehrung (dieses wird mit HbA_1 eluiert (32)), bei chronischer Niereninsuffizienz durch Carbonyl-Hämoglobin (32), bei Aspirin-Dauermedikation durch Acetyl-Hämoglobin (32), bei Eisenmangel-Anämie durch verlängerte Erythrozyten-Lebensdauer (12), bei Hyperlipidämien (Lipide werden mit HbA_1 eluiert) (21).

Zu falsch niedrigen Werten kommt es bei Hämoglobinopathien wie HbS, HbC, HbE - sie eluieren mit HbA_0 (32) -, bei hämolytischen Anämien aufgrund verkürzter Erythrozyten-Lebensdauer (16,61), bei Blutungen und Hämochromatose durch verkürzte Verweildauer der Erythrozyten (74).

2.4. Verwendung des Cocktail X als Aldimin-Eliminator

Wie bereits erläutert ist für die retrospektive Langzeitkontrolle des Blutzuckers lediglich die Ketoaminform der glykosylierten Hämoglobine verwendbar, während die labile Aldiminform durch eine kurzzeitig zurückliegende Hyperglykämie zustande kommt.

D-Glucose liegt bei pH 7,0 und einer Konzentration von 100 m mol Glucose nur zu 0,001% in der offenen Aldehydform vor. Diese offene Aldehydform reagiert reversibel mit primären Aminen zur Schiffschen Base (= Aldimin-Form). Die Reversibilität der Aldimin-Form konnte nach Glykosylierung von Hämoglobin in vitro durch anschließende Dialyse gezeigt werden (68). Wegen der weiten Verbreitung von Schiffschen Basen in der enzymatischen Katalyse wurde nach kurzzeitig wirkenden Eliminatoren der Aldiminform gesucht. Auf der Basis von Modelluntersuchungen von Fischer et al. (1959), Cordes und Jencks (1962), Hine et al. (1970) wurden folgende Eliminatoren von Aldiminen bereits getestet: Hydroxilamin, Hydrazin und Derivate, Semicarbazid.

Diese Verbindungen lösen durch nucleophilen Angriff die Schiffsche Base und führen zu einer "Trans-Schiffization", wobei das Amin der Schiffschen Base freikommt (29).

$$R_1 - \overline{N} = R_2 + H_2N - NH - CO - NH_2 \text{ --}$$

$$R_1 - NH_2 + R_2 = \overline{N} - NH - CO - NH_2$$

An den Eliminator werden nach Reinauer/Niederau (68) folgende Forderungen gestellt:

1) Keine Veränderung des Absorptionsspektrums von Hämoglobin.
2) Keine Beeinflussung der säulenchromatischen Auftrennung von HbA_1.
3) Keine zusätzliche Reaktion mit anderen funktionellen Gruppen.

Vom Hersteller der von uns verwendeten Mikrosäulen-Methode ist ebenfalls ein spezifischer Aldimin-Eliminator entwickelt worden, der als Cocktail X bezeichnet wird (60) und der den Forderungen von Reinauer/Niederau (68) entsprechen soll, wie im folgenden gezeigt wird.

Die Erläuterungen zum Aldimin-Eliminator (Cocktail X) entsprechen den Angaben des Herstellers (60).

Zur Entwicklung des endgültigen Cocktails wurden sechs verschiedene Substanzkombinationen systematisch durchgetestet. Es konnte gezeigt werden, daß auch extreme Hyperglykämien die Beseitigung der Aldiminform nicht stören können. Weiterhin wird der pH des Cocktails X so eingestellt, daß er die nachfolgende säulenchromatische Auftrennung nicht stört; er verändert auch das spektroskopische Verhalten von Hämoglobin nicht. Die Beseitigung der Aldiminform erfolgt innerhalb von Minuten. Als Standardzeit wurden zehn Minuten angenommen, da diese Zeit zur Vorbereitung der Mikrosäulen erforderlich ist.

2.4.1. Keine Veränderung des Absorptionsspektrums von Hämoglobin und der säulenchromatischen Auftrennung von HbA_1

100 µl Vollblut und 20 µl Cocktail seien laut Hersteller gemischt und bei Zimmertemperatur stehen gelassen worden. In die Mikrosäulen sei eine Spatelspitze Quarzsand gegeben (maximal bis zum Säulenknick) und mit 500 µl Elutionslösung benetzt worden. 50 µl Hämolysat seien auf die Säule gegeben und wie üblich eluiert worden.

Dabei habe laut Hersteller (60) der Cocktail das bei 415 nm gemessene Absorptionsspektrum weder verändert, noch sei eine Verfälschung der säulenchromatischen Auftrennung der HbA_1-Fraktion erfolgt. Dies gehe aus folgenden Analysen von Pat.Blut hervor:

Pat.1 :	ohne	Cocktail	10,6 %	HbA_1
	mit		10,0 %	
Pat.2 :	ohne	Cocktail	11,56 %	HbA_1
	mit		11,33 %	
Pat.3 :	ohne	Cocktail	8,64 %	
	mit		8,04 %	

2.4.2. Nachweis der Wirkung an der Aldiminform

Zum Nachweis der Beseitigung der Aldiminform sei vom Hersteller (60) EDTA-Blut von normalen und diabetischen Probanden durch in vitro Inkubation mit 50 mM Glucose glykosyliert worden. Erfahrungsgemäß entstehe dabei ein relativ hoher Prozentsatz Aldiminform, an der die Wirkung des Cocktails geprüft werden könne.

Aus den Inkubationsansätzen seien stündliche Proben entnommen und auf Gesamtkonzentration der glykosylierten Hämoglobine untersucht worden. Die Inkubationsdauer habe insgesamt sechs Stunden betragen. Weiterhin sei ein Teil des Ansatzes über 14 Stunden gegen 0,05M Phosphatpuffer dialysiert worden. Ein weiterer Teil sei mit pH-Shift behandelt worden.

Das Ergebnis des Versuchs zeige, daß der Cocktail den gleichen Effekt wie die Dialyse habe. Bemerkenswert an diesem Versuch ist, daß während des Versuchs eine meßbare Umwandlung der Aldiminform in die Ketoaminform erfolgt sei.

Auch bei weiteren Glykosylierungsversuchen des Herstellers (60) sei deutlich geworden, daß die Umlagerungskinetik der Aldiminform in die stabile Ketoaminform unterschiedlich verlaufe. Auf die Geschwindigkeit hätten verschiedene Ionen Einfluß, z.B. Phosphat.

Es habe gezeigt werden können, daß der Cocktail die Aldiminform quantitativ beseitige.

Im Hinblick auf eventuelle Störungen räumt der Hersteller (60) ein, daß bei Anwendung des Cocktail X, das Blut möglichst bald nach Probennahme analysiert werden solle. Es gebe Anhaltspunkte dafür, daß eingefrorenes Blut ebenfalls eine andere Umlagerungskinetik habe, als natives Blut. Die Haltbarkeit des Cocktails sei auch bei Zimmertemperatur sehr gut. Die Lagerung über vier Wochen beeinträchtige die Wirkung nicht. Der Eliminator ist also nicht so lange lagerungsfähig wie die anderen Reagenzien (laut Hersteller, Laufzeit von vier Monaten). Dies ist bei den Tests zu berücksichtigen.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß nach den Angaben des Herstellers der vorliegende, von uns verwendete Cocktail zur Beseitigung der Aldiminform den beiden ersten Prämissen von Reinauer / Niederau (68) entspricht: Er verändert weder das Absorptionsspektrum von Hämoglobin, noch die Auftrennung von HbA_1. Die Wirkung des Cocktails an der Aldiminform wurde ebenfalls nachgewiesen, wobei man sich hier noch eine genauere Nachprüfung über die Spezifität des Eliminators und den Ausschluß zusätzlicher Reaktionen mit anderen funktionellen Gruppen wünschen könnte.

Da aber eine Beseitigung der Aldiminform durch Dialyse, pH-Shift nicht praktikabel erscheint, wurde der angebotene Eliminator mit in das Testsystem übernommen.

D. Ergebnisse

1. Teilnahme am Ringversuch im Oktober 1981

Im ersten Teil der Untersuchung sollte nachgewiesen werden, inwieweit die Mikrosäulen-Chromatographie den Anforderungen entspricht, die in der Rechtsmedizin an die Verarbeitung von Blutproben gestellt werden.

Zur Überprüfung der eigenen Arbeitsgenauigkeit mit der Mikrosäulen-Chromatographie entsprechend den Testunterlagen des Herstellers (26), haben wir deshalb im Oktober 1981 an einem erstmals durchgeführten Ringversuch teilgenommen, der vom Institut für Standardisierung und Dokumentation im Medizinischen Laboratorium e.V. (INSTAND), Düsseldorf, unter Leitung von Prof. Dr. Reinauer durchgeführt worden ist.

Dabei wurden von uns zwei Proben bearbeitet und eingerichtet. Der Vergleich mit den Referenzproben erbrachte einen guten Erfolg: Beide Proben erreichten den Zielwert mit jeweils weniger als einem Fehlerpunkt Abweichung gegenüber den Referenzwerten. Insgesamt verlief der Ringversuch ebenfalls erfolgreich: Mit einer Teilnehmerzahl von 114 lag die Erfolgsquote bei 83,3 %.

Nach dem positiven Ergebnis des Ringversuches ging es danach aber darum, ob der Test auch unter modifizierten Bedingungen anwendbar bleibt.

2. Anwendbarkeit der Methode auch ohne Antikoagulation der Blutproben bei Homogenisieren des Blutes

2.1. Versuche mit Vollblut - nicht homogenisiert, nicht vorbehandelt

Laut Hersteller sollen die Proben als frisches Vollblut oder mit NaF oder EDTA als Antikoagulanz versetzt, zur Anwendung kommen (60).

Gerade diese beiden Bedingungen sind aber bei Blutproben, die an einem rechtsmedizinischen Institut untersucht werden, in der Regel nicht zu erfüllen. Asservierte Blutproben kommen in den seltensten Fällen frisch abgenommen sofort zur Auswertung; die Gerinnungsprozesse sind bis dahin bereits abgelaufen. Nach Rick (71) tritt die Gerinnung normalerweise innerhalb der ersten zehn Minuten ausserhalb des Körpers durch Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin ein.

Andererseits sollte versucht werden, chemische Zusätze weitgehend (wie in diesem Fall NaF oder EDTA) bei Asservaten zu vermeiden, da durch diese selbst eventuell Störungen oder Verfälschungen auftreten, die die Aussagekraft vor Gericht empfindlich abschwächen könnten.

Es sollte deshalb versucht werden, in Abweichung von den Herstellerangaben, auch nicht frisch abgenommenes, bis zu einigen Tagen altes Blut den Testbedingungen zu unterwerfen und herauszufinden, ob die Ergebnisse verwertbar seien.

Zu diesem Zweck sind zwei Zehnfach-Bestimmungen mit geronnenem Vollblut von stoffwechselgesunden Probanden durchgeführt worden. Die Messungen des Gesamt-HbA_1 aus dem geronnenen Vollblut erfolgten in der weiteren Durchführung wie in den oben beschriebenen Angaben des Herstellers (60).

Die Ergebnisse waren allerdings vollkommen unbefriedigend. Im ersten Fall (Abb.8) berechnete sich die einfache Streuung mit s=2,46, was einem Variationskoeffizienten von 25% entspricht. Im zweiten Fall (Abb.9) ergab die einfache Streuung s=2,03 und VK=21 %. Die Ergebnisse zeigten, daß die Methode mit geronnenem Blut nicht anwendbar ist.

Bereits bei der Versuchsdurchführung hatte es sich als äußerst schwierig erwiesen, mit den 50 µl Eppendorfpipetten aus dem geronnenen Blut exakte Mengen zu entnehmen. Die möglicherweise schon unterschiedliche Entnahme der Proben ist zumindest an den großen Differenzen bei den Werten der Zehnfach-Bestimmung mitbeteiligt gewesen. Diese Schwierigkeit würde bei nicht nur geronnenem Blut, sondern bei Blut, in dem die Trennung in Blutkuchen und Serum bereits erfolgt ist, noch größer werden. Nach Schmidt-Thews (79) erfolge diese Trennung, eingeleitet durch Retraktion der Fibrinfäden innerhalb einiger Stunden nach der

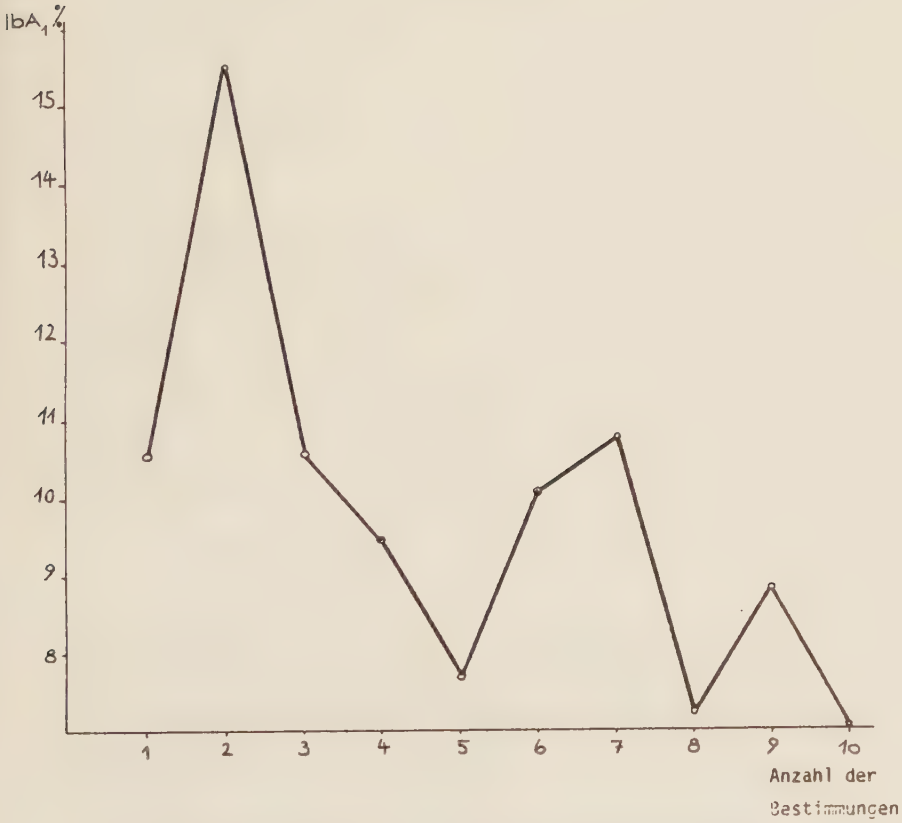


Abb.8: Zehnfachbestimmung des HbA_1 aus einer nicht homogenisierten geronnenen Vollblutprobe ($\bar{x}$=2,46, VK=25 %)

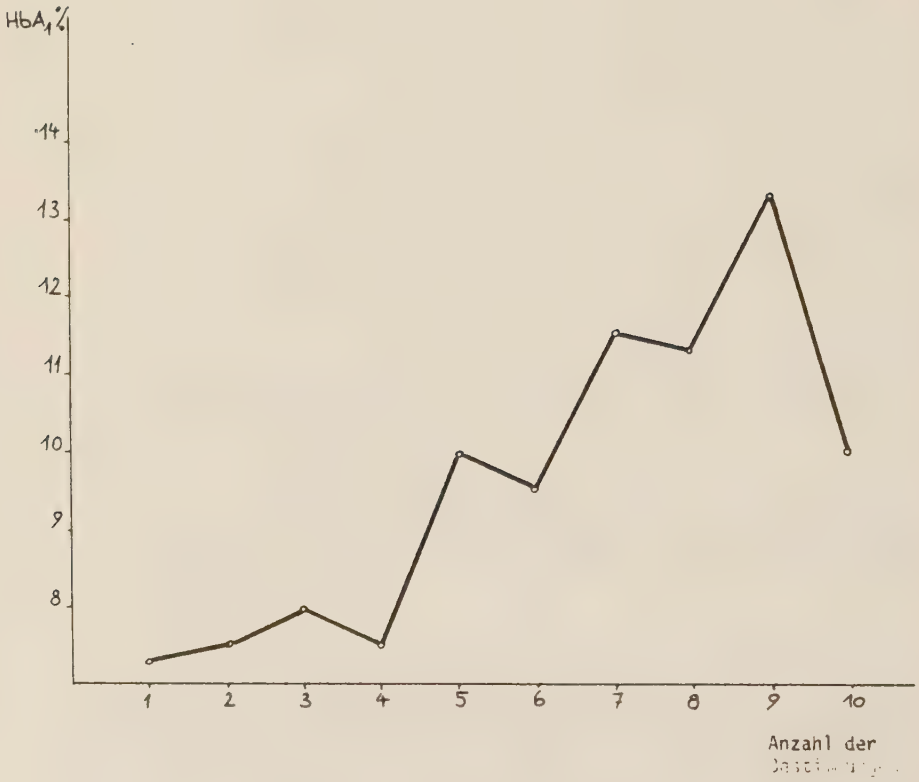


Abb.9: Zehnfachbestimmung des HbA_1 aus einer nicht homogenisierten, geronnenen Vollblutprobe (S=2,03, VK=21%)

Blutentnahme außerhalb des Körpers. Da auch bis zu menreren Tagen alte Proben zur Auswertung kommen sollten, ist dies auf jeden Fall zu berücksichtigen.

2.2. Untersuchungen an homogenisierten Vollblutproben im Vergleich mit EDTA-Blut

Da eine chemische Aufbereitung der Proben mit Antikoagulantien möglichst vermieden werden sollte, entschieden wir uns für eine mechanische Methode der Homogenisierung des Blutes mittels eines käuflichen Homogenisators.

Sie ist sehr einfach und schnell durchzuführen. Die Blutprobe wird dazu in einen dickwandigen Glaszylinder gegeben. In dem Zylinder wird ein Teflonstempel so lange hin und her bewegt, bis das Blut dem Augenschein nach homogen aussieht.

Zwischen Glaszylinder und Teflonstempel besteht ein definierter Abstand von 2-Erythrozyten-Durchmessern.

Es wurden wieder Zehnfach-Bestimmungen des Gesamt-HbA_1 mit der Mikrosäulenmethode durchgeführt. Das Blut stammte von ein und demselben Stoffwechselgesunden (Eigenblut). Die Zehnfach-Bestimmung des nicht homogenisierten, nicht mit Antikoagulantien versetzten, geronnenen Blutes vom selben Tag erbrachte wiederum unzuverlässige Ergebnisse, die diesmal mit einer Streuung von s=0,67, VK=10,15 % zwar besser waren, aber damit immer noch nicht akzeptabel wurden (Abb.10). Dagegen erreichte dasselbe Blut nach vorheriger, oben beschriebener Homogenisierung im Glaszylinder mit einer einfachen Streuung von s=0,18 und einem Variationskoeffizienten VK=2,25 % ein sehr gutes Ergebnis (Abb.11)

Der Vergleich dieser Zehnfach-Bestimmung des homogenisierten Vollblutes mit einer Zehnfach-Bestimmung des mit EDTA antikoagulierten Blutes vom selben Probanden zeigte ebenfalls ein senr gutes Ergebnis (Abb.11) (s=0,23, VK=2,8 %).

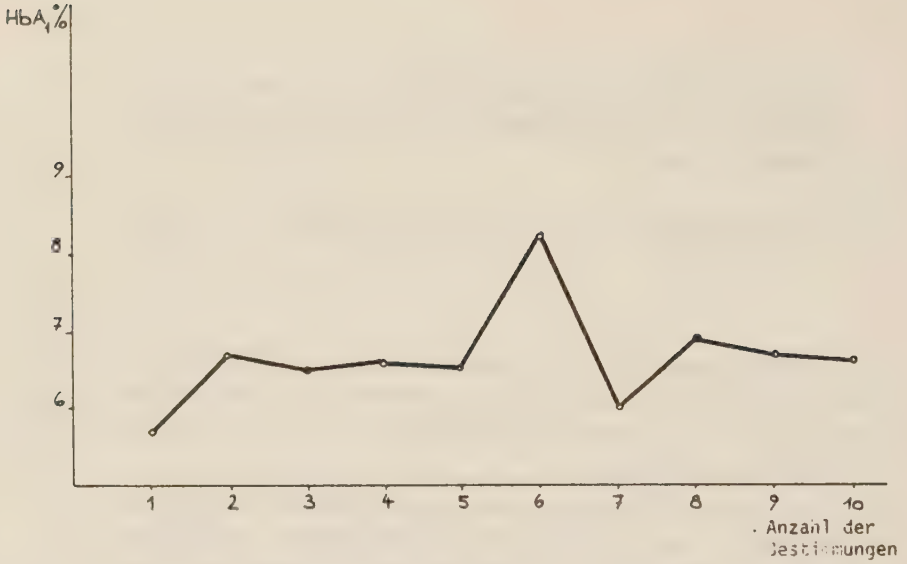


Abb.10: Zehnfach-Bestimmung des HbA_1 aus einer nicht homogenisierten Vollblutprobe (s=0,67, VK=10,15 %)

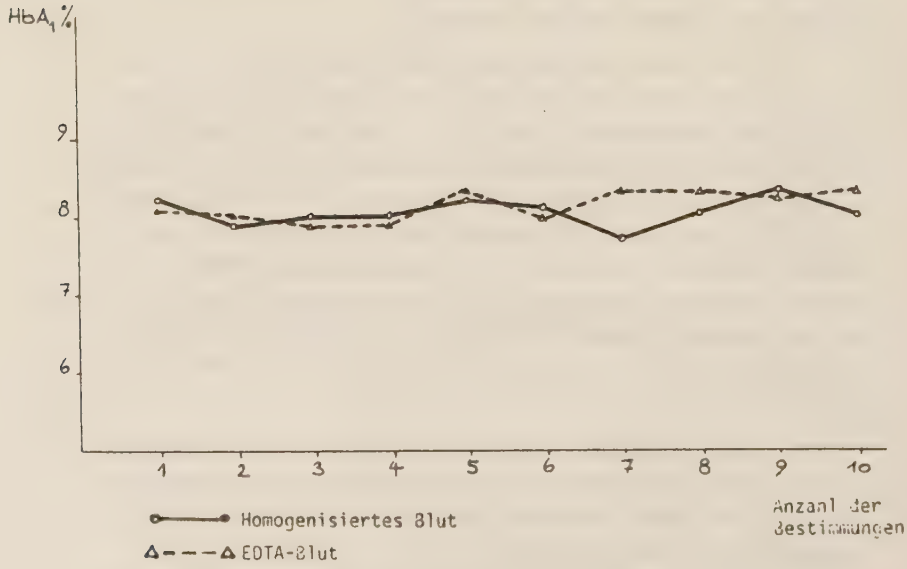


Abb.11: Vergleich zweier Zehnfach-Bestimmungen des HbA_1: homogenisiertes Vollblut gegen EDTA-Blut (für EDTA-Blut: s=0,23, VK=2,8%, für homogenisiertes Vollblut: s=0,18, VK=2,25 %)

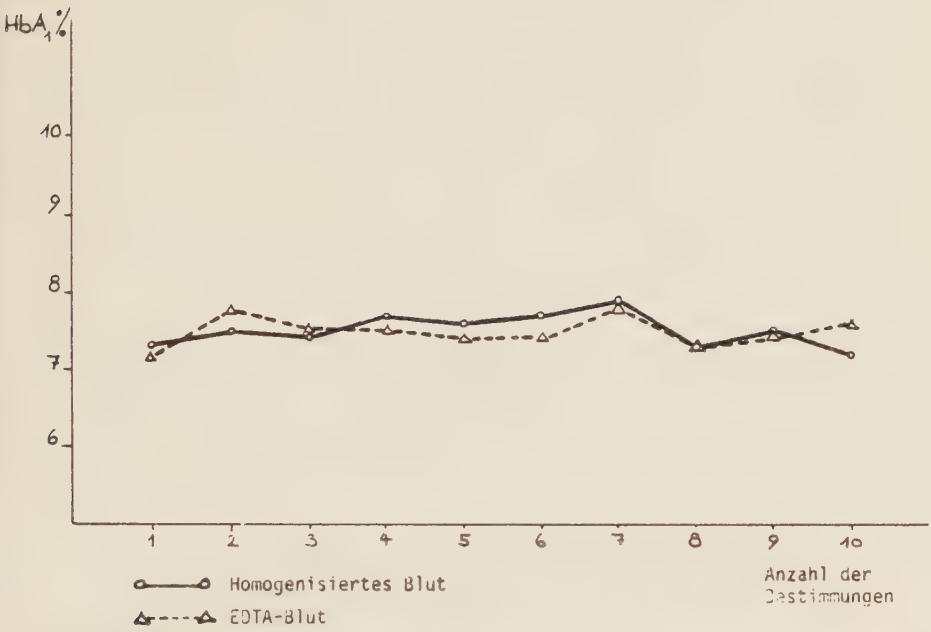


Abb.12: Vergleich zweier Zehnfach-Bestimmungen desselben Probanden: homogenisiertes Vollblut gegen EDTA-Blut (für EDTA-Blut: s=0,19, VK=2,5%, für homogenisiertes Vollblut: s=0,21, VK=2,8 %)

Die Gegenüberstellung einer zehnfach-bestimmten, homogenisierten Vollblutprobe und des ebenfalls zehnfach-bestimmten mit EDTA antikoagulierten Blutes vom selben Probanden wurde an einem anderen Tag nochmals wiederholt und erbrachte auch diesmal sehr gute vergleichbare Werte (Abb. 12). Die einfache Streuung der jeweiligen Serie war gering (s = 0,21 = VK = 2,8 % beim homogenisierten Blut, s = 0,19 = VK = 2,5 % beim EDTA-Blut), und die aus dem homogenisierten Blut gewonnenen Werte lagen nahe bei den aus dem EDTA-Blut bestimmten Werten.

Damit konnte gezeigt werden, daß die mechanische Homogenisierung von bereits geronnenem Blut als Methode zur Vorbereitung der Proben für eine HbA_1-Bestimmung mit Hilfe der Mikrosäulen-Chromatographie ebenso verläßlich ist, wie die Vorbehandlung des Blutes mit dem Antikoagulanz EDTA.

Dieser Nachweis bezog sich allerdings auf das Blut von stoffwechselgesunden Probanden. Da die Mikrosäulenmethode aber insbesondere beim Nachweis beziehungsweise zur Überprüfung eines Diabetes mellitus zur Anwendung kommt, waren noch weitere Untersuchungen notwendig.

3. Anwendbarkeit der modifizierten Mikrosäulenmethode bei insulinpflichtigen Diabetikern mit erhöhten Blut-Glucose-Spiegeln

In sieben Fällen von insulinpflichtigen Diabetikern wurden die HbA_1-Werte bestimmt. Zum Vergleich wurde dabei wieder das Gesamt-HbA_1 sowohl in EDTA-Blut als auch in homogenisiertem Vollblut gemessen. Die aktuellen Blutzuckerwerte waren hierbei bekannt.

Auch in dieser Reihe waren die Differenzen zwischen EDTA-Blut und Vollblut vernachlässigbar gering. Sie lagen zwischen minimal 0,1% HbA_1 und maximal 0,25% HbA_1 (Abb.13).

Die Korrelation der aktuellen Blutzuckerwerte mit den HbA_1-Werten war nicht in jedem Falle anzunehmen, da die Einstellungsqualität der einzelnen insulinpflichtigen Diabetiker als sehr unterschiedlich einzuschätzen war.

Es konnte aber gezeigt werden, daß die Methode der Mikrosäulen-Chromatographie nach Homogenisierung der Blutproben auch bei höheren Blutzuckerwerten bzw. labiler Stoffwechsellage aussagefähig ist.

Insgesamt ließ sich also nachweisen, daß die modifizierte Methode mit mechanischer Homogenisierung sowohl bei Normoglykämikern als auch bei Hyperglykämikern anwendbar ist.

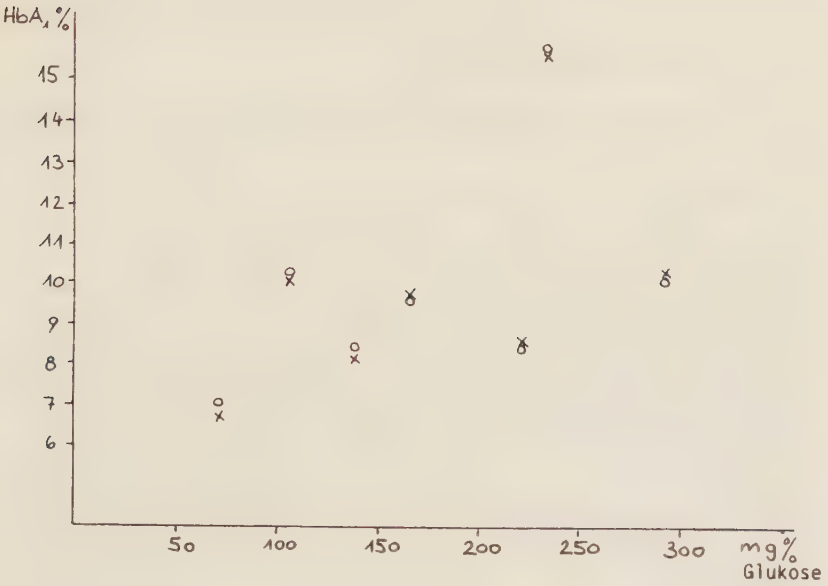


Abb.13: Paralleloestimmung der HbA_1-Werte aus EDTA-Blut (0) und homogenisiertem (x) Vollblut von insulinpflichtigen Diabetikern bei jeweils bekannten Blutzuckerwerten

4. Konstanz der HbA_1-Werte bei bis zu zwei Wochen als Vollblut gelagerten Blutproben

Laut Hersteller (60) könnten die Proben als Vollblut,nicht als Hämolysat, maximal eine Woche im Kühlschrank gelagert werden.

Wir führten deswegen Messungen des Gesamt-HbA_1 in dem homogenisierten Vollblut eines Stoffwechselgesunden über diesen angegebenen Zeitraum hinaus durch.

Insgesamt wurde das HbA_1 viermal innerhalb von 14 Tagen gemessen. Die erste Messung fand noch am selben Tag, aber nach Eintreten der Gerinnung, die zweite Messung am dritten Tag, die dritte am zehnten Tag, die vierte am 14. Tag statt. Das Blut wurde bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt und vor jeder Messung homogenisiert.

Die drei ersten Messungen wurden fünffach bestimmt, die letzte dreifach.

Die jeweilige Standardabweichung innerhalb der einzelnen Serie war gering: $s_1 = 0,18$, $s_2 = 0,12$, $s_3 = 0,27$, $s_4 = 0,10$. Dabei lagen die Mittelwerte der einzelnen Serie mit $x_1 = 6,9$, $x_3 = 6,6$, $x_4 = 6,6$ sehr nahe beieinander, so daß man von einer Konstanz der HbA_1-BEstimmung innerhalb des Zeitraumes von 14 Tagen sprechen kann.

Dies gilt zunächst für Blutproben von Normoglykämikern. Bei Diabetikern könnte diese Aussage eine Veränderung erfahren, da - in allerdings nur einem Fall - eines insulinpflichtigen Diabetikers nach einer 15-tägigen Lagerung der Vollblutprobe im Kühlschrank bei +4°C ein Anstieg der Gesamt-HbA_1-Fraktion von 10,1% auf 12,0% zu messen war. Die Vergleichsmessung des HbA_1 aus EDTA-Blut ergab ebenfalls einen Anstieg von 10,2% auf 12,2%.

In diesem Zusammenhang ist noch auf einen wichtigen Gesichtspunkt der Mikrosäulen-Chromatographie hinzuweisen: Lagerungsbedingte Konzentrationsänderungen z.B. durch Wasserverlust brauchen bei dieser Methode nicht berücksichtigt zu werden; d.h. eine H_2O-Gehalts- oder Hämatokrit-

bestimmung mit entsprechender Umrechnung wie etwa von Sippel et al.(84) empfohlen, sind nicht erforderlich. Dies ergibt sich daraus, daß bei der Mikrosäulen-Chromatographie die Extinktionen der glykosylierten, schnell wandernden Hämoglobine (HbA_{1a+b+c}) und der "Rest-Hämoglobine" (HbA_0+HbA_2) immer nebeneinander bestimmt werden. Die Prozentwerte der HbA_{1a+b+c}-Fraktion errechnen sich dann nach der Formel:

$$HbA_{1a+b+c}\,\% = \frac{A}{A + 5H} \times 100\ \%$$

(mit A = Extinktion von HbA_{1a+b+c}, H = Extinktion von HbA_0+ HbA_2).

Damit errechnet sich die Gesamt-HbA_1-Fraktion immer als Relativkonzentration gegenüber HbA_0 + HbA_2. Änderungen des Hämatokrits spielen also bei der HbA_1-Messung mit der Mikrosäulen-Chromatographie keine relevante Rolle.

5. Keine Abhängigkeit des HbA_1 bei Vollbluten mit erhöhter Blutalkoholkonzentration (BAK)

Veränderungen des Blutzuckerspiegels durch die einmalige oder chronische Zufuhr von Alkohol wurden in der Literatur mehrfach diskutiert (4,43,49,83). Sowohl ein Anstieg des aktuellen Blutzuckers unmittelbar nach Gabe von Alkohol, als auch Hypoglykämien besonders bei chronischem Alkoholismus in Verbindung mit unzureichender Ernährung werden beschrieben. Auf die möglichen pathogenetischen Hintergründe soll in der Diskussion näher eingegangen werden.

Da an rechtsmedizinischen Instituten oft Blutproben mit erhöhten Blutalkoholkonzentrationen (=BAK) zur Auswertung kommen, bestand die nächste Aufgabe dieser Arbeit darin zu prüfen, inwieweit sich eine Abhängigkeit der HbA_1-Konzentration vom Alkoholspiegel im Blut in asservierten Proben nachweisen läßt.

Als Material dienten die im Rahmen von Trinkversuchen am Institut für Rechtsmedizin abgenommenen Vollblutproben von gesunden Probanden.

Es kamen 15 Blutproben mit unterschiedlich hohen BAK-Werten von minimal 0,65 % bis maximal 1,18 % zur Auswertung. Alle Proben stammten aus einem Trinkversuch innerhalb des Instituts; chronischer Alkoholismus oder eine Stoffwechselkrankheit waren in keinem der Fälle bekannt. Sämtliche Proben waren geronnen, wurden nach dreitägiger Lagerung im Kühlschrank bei +4°C homogenisiert und anschließend jeweils die HbA_1-Werte bestimmt.

Nach Errechnen des Korrelationskoeffizienten mit $r_{xy} = 0,103$ und aus den divergierenden Regressionsgeraden in der Abb.14 läßt sich somit eine Abhängigkeit der Gesamt-HbA_1-Konzentration von der Höhe des Blutalkoholspiegels nicht erkennen.

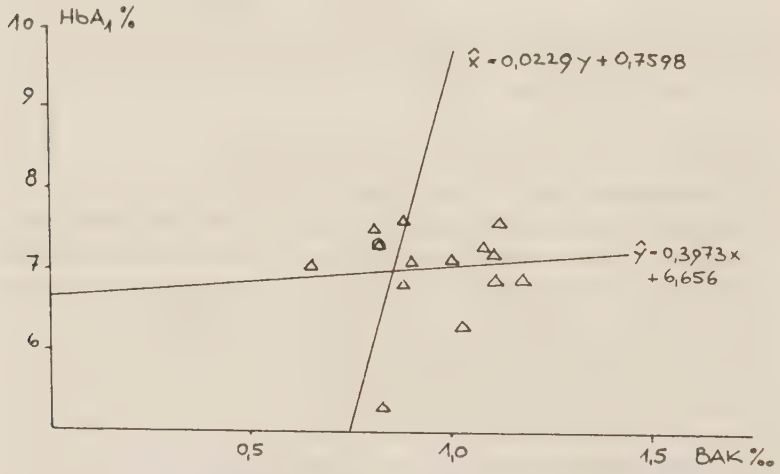


Abb. 14: Zuordnung der HbA_1-Konzentration zu den BAK-Werten aus Blutproben mit erhöhten BAK-Werten. (Normoglykämiker, Nicht-Alkoholiker)
Korrelationskoeffizient: $r_{xy} = 0,1033$
Regressionsgeraden: $\hat{x} = 0,0229\ y + 0,7598$
$\hat{y} = 0,3973\ x + 6,656$

6. Keine Abhängigkeit der HbA_1-Werte in Vollblutproben mit erhöhter Blutalkoholkonzentration (=BAK) bei Diabetikern.

Als nächstes sollte geprüft werden, inwieweit dieses Ergebnis eine Veränderung für Diabetiker mit erhöhter Blutalkoholkonzentration erfährt oder nicht.

Elf asservierte Blutproben von Diabetikern, von denen einer insulinpflichtig war, standen zur Verfügung. Die BAK-Werte schwankten zwischen 0,03 % minimal und 2,2 % maximal. Die Testbedingungen entsprachen den oben beschriebenen.

Es errechnete sich für diese elf Fälle ein Korrelationskoeffizient von rxy = 0,297 mit den zwei divergierenden Regressionsgeraden =0,079 y + 0,972 und y = 1,114x + 7,191. Daraus läßt sich ersehen, daß auch für Diabetiker keine Abhangigkeit zwischen HbA_1 und BAK besteht (Abb.15).

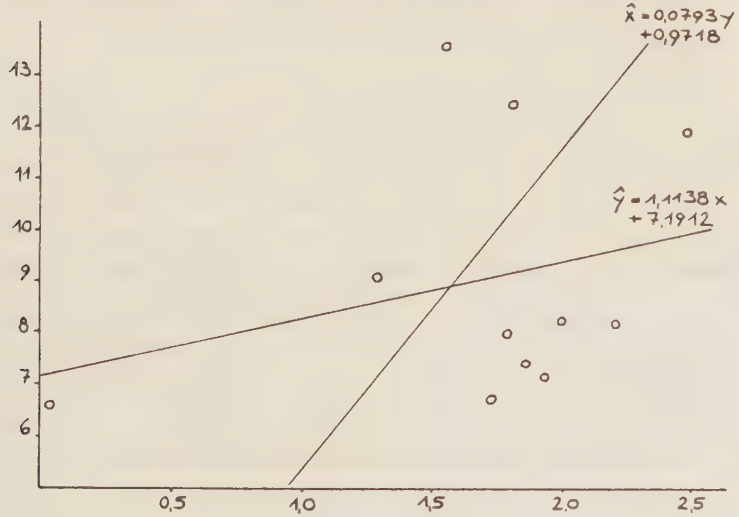


Abb.15: Zuordnung der HbA_1-Konzentration zu den BAK-Werten aus Blutproben mit erhöhten BAK-Werten (Diabetiker, Nichtalkoholiker)
Korrelationskoeffizient: $r_{xy} = 0,297$
Regressionsgeraden: $\hat{x} = 0,079y + 0,972$
$\hat{y} = 1,114x + 7,191$

E. Diskussion

1. Probleme der nachträglichen Blutzucker-Bestimmung

Die in rechtsmedizinischen Instituten zur Auswertung eingelieferten Blutproben werden meist als Vollblut eingeschickt. Dies erfolgt aus gutem Grunde, da die Proben den verschiedensten Tests unterzogen werden und ein Versetzen mit Chemikalien, wie z.B. Antikoagulantien - erfolgte es von vorneherein und in jedem Falle - die Aussagefähigkeit von bestimmten Untersuchungen, die streng aus Vollblut zu gewinnen sind, in erheblichem Maße einschränken würden.

Gerade aber im Hinblick auf die nachträgliche Bestimmung eines aktuellen Blutzuckerwertes führt diese Praxis zu erheblichen Problemen.

Da die glykolytischen Reaktionen in der Erythrozyten in vitro weiter ablaufen, würde die im Blut vorhandene Glucose abgebaut und es käme zu einer falsch erniedrigten Messung des aktuellen Blutzuckers. Deswegen wird das venöse Blut gewöhnlich nicht nur mit einer Substanz versetzt, die die Gerinnung verhindert (z.B. Na-oxalat oder K-EDTA in einer Konzentration von ca. 1mg/ml Blut), sondern auch mit einem Glykolysehemmstoff (z.B. NaF in einer Konzentration von ca. 1 mg/ml Blut), in dessen Anwesenheit die Glucosekonzentration bei Raumtemperatur ca zwölf Stunden und bei +4°C etwa 48 Stunden lang konstant bleibe (70).

Eine zweite Möglichkeit bestünde darin, das Blut sofort zu zentrifugieren, also das Serum vom Blutkuchen zu trennen und dem Glykolysesystem der Erythrozyten somit das Substrat zu entziehen. Zur Zeit der Einlieferung der Proben käme dies aber bereits zu spät.

Darüber hinaus beinhalten die einzelnen Methoden zur Messung des Blutglucosespiegels noch Störmöglichkeiten. Bei der O-Toluidin-Methode muß das Reagenz lichtgeschützt aufbewahrt werden. Blut von Patienten, die mit Dextranlösungen behandelt worden sind (z.B. Makrodex^{R}) wird trüb und gibt fälschlich höhere Werte (49).

Bei der Hexose-Glucose-6-P-Dehydrogenase-Methode führt eine ungenügende Reinheit der Hilfsenzyme zu falschen Bestimmungen (70).

Die Glucose-Oxidase-Peroxidase-Methode ergibt bei Vorhandensein von Vit.-C-Konzentration (z.B. durch intravenöse Injektion) durch Konkurrenz mit dem Indikator um das entstandene Wasserstoffperoxid falschniedrige Werte; gleiches gilt für hohe Harnsäurespiegel im Blut und bei Verwenden von Trichloressigsäure oder Perchlorsäure zur Fällung des Eiweisses. (70).

Wenngleich auch gewisse Störfaktoren dadurch entfallen können, daß man auf andere chemische Mittel ausweicht (z.B. statt Perchlorsäure oder Trichloressigsäure bei der GOP-Methode Uranylacetat zur Enteiweißung) bleiben doch immer noch verfälschende Einflußmöglichkeiten bestehen, die zu nicht unerheblichen Unsicherheiten bei der Gewinnung einer verläßlichen Aussage über den aktuellen Blutzuckerwert führen. So kann die Blutzuckerkonzentration durch Regulationsvorgänge, im Rahmen komplexer endokrinologischer Reaktionen verändert werden. Im Falle eines Schockgeschehens können Streßhormone wie Noradrenalin, Adrenalin und Cortisol durchaus zu einer akuten Blutzuckererhöhung führen. Ebenso kann Asphyxie oder Hypoxie die Blutzuckerwerte erhöhen, wahrscheinlich auch über die Freisetzung von Adrenalin (54). Ein peripherer Blutzuckeranstieg auf über 500 mg/100g wurde nach kardiopulmonaler Reanimation in fast 10 % von nicht diabetischen Fällen beschrieben (24).

Dies bedeutet, daß die Aussagefähigkeit einer nachträglichen Glucosebestimmung nach Schockereignissen, Zuständen von Asphyxie oder Hypoxie oder nach Reanimationen besonders bei Diabetikern eingeschränkt ist. Ebenso liesse sich die Hypoglykämie eines Diabetikers nach Diätfehler, nach einem Infekt oder nach einer adäquaten Insulingabe nach einem derartigen Ereignis nicht mehr sicher nachweisen, da es durch die Stressnormone zu einem Ausgleich der Hypoglykämie bis hin zur Normo- oder sogar Hyperglykämie gekommen sein kann.

Anzumerken ist auch noch, daß ein einmaliger Blutzuckerwert quasi nur eine Momentaufnahme darstellt und nichts über die Qualität der Stoffwechseleinstellung mit geringer oder höherer Gefahr der Entgleisung aussagt.

Ist man in der Verkehrsmedizin bzw. im Strafrecht zur Frage einer hyper-oder hypoglykämischen Reaktion nun schon häufig lediglich auf Zustands- und Geschehensablaufbeschreibung angewiesen, so gewinnt dieser Aspekt an Bedeutung.

2. Bedeutung der modifizierten Mikrosäulenmethode für die Aussage über die Stoffwechsellage bei Diabetikern

Mit der Bestimmung des Gesamt-HbA_1 nach Eliminieren der labilen Aldiminform läßt sich - wie bereits eingangs kurz erwähnt - zwar keine Aussage über den Blutzuckerwert zur Zeit der Blutentnahme machen, damit kann aber sehr wohl eine über einen längeren Zeitraum (vier bis sechs Wochen) bestehende hyperglykämische Stoffwechsellage retrospektiv erfaßt werden.

Mit der von uns modifizierten Mikrosäulen-Chromatographie gelingt dies auch aus Vollblut, sofern es dem mechanischen Homogenisierungsprozeß unterworfen wird. Eine Antikoagulation der Blutproben ist also nicht notwendig. Alle anderen Testbedingungen wie konstante Temperatur bzw. Temperatur-Korrektur mittels Tabelle, pH-Stabilität müssen streng beachtet und eingehalten werden. Untersuchungen anderer Arbeiten über die Mikrosäulenmethode aus homogenisierten Vollblutproben sind uns bisher nicht bekannt, sodaß sich keine Vergleichsmöglichkeiten bieten.

Mit dieser Methode erhält man demnach Aufschluß über die mittlere Blutzuckerlage und kann mit zusätzlichen Informationen aus der Vorgeschichte die Wahrscheinlichkeit einer akuten Stoffwechselbelastung z.B. in Richtung Hyperglykämie besser abschätzen.

Dabei bereitet es allerdings doch noch eine gewisse Schwierigkeit, einen bestimmten HbA_1-Wert anzugeben, von dem an aufwärts sicher von einer hyperglykämischen Stoffwechsellage zu sprechen wäre.

Horstkotte (45) spricht bereits bei einer HbA_1-Konzentration von über 8,0 % von der hohen Wahrscheinlichkeit eines manifesten Diabetes mellitus. Andererseits gilt ein HbA_1-Wert von 8-10 % bei einem behandelten

Diabetiker nach allgemeiner Übereinkunft heute als ein "gut eingestellter" Diabetiker (9,41,75). Hier ergibt sich möglicherweise eine notwendige Differenzierung zwischen der Messung einer HbA_1-Konzentration im Bereich von 8 - 10 % bei bereits bekannten und behandelten Diabetikern und bisher nicht erkannten, jetzt Diabetesverdächtigen. Für Diabetiker in therapeutischer Kontrolle würde dies einem anzustrebenden, nicht mehr zu verbessernden Normbereich entsprechen (41), für einen bisher nicht erkannten Diabetiker müßte ein Wert in dieser Höhe Anlaß zu weiteren Untersuchungen geben.

Werte über 10 % Gesamt-HbA_1 werden von Schernthaner (75), Bottermann (9) und Henrichs (41) als Ausdruck einer diabetogenen "schlechten" Stoffwechsellage gewertet bzw. als verbesserungsbedürftige Einstellungsqualität bei Diabetikern angesehen.

In den eigenen Untersuchungen waren von sieben insulinpflichtigen - also behandelten - Diabetikern die HbA_1-Werte bestimmt worden. Die aktuellen Blutzuckerwerte waren ebenfalls bekannt.

Somit könnte man folgende Einteilung der Einstellungsqualität dieser Diabetiker treffen: Die beiden Fälle mit HbA_1-Werten von 7 % bzw. knapp über 8 % und Blutzuckerwerten von 70 mg % bzw. 140 mg % weisen auf eine kurz- und langfristig gute Einstellung hin. Im Fall des Diabetikers mit einem aktuellen Blutzucker von 220 mg % aber einem mit 8 % im Normbereich liegenden HbA_1 müßte man von einer langfristig guten Einstellung bei kurzfristiger Glukose-Belastung ausgehen. Der Diabetiker mit dem aktuellen Glukosewert um 100 mg % mit dem über 10 % erhöhten HbA_1 ist als langfristig schlecht, kurzfristig allerdings gut eingestellt zu betrachten und wäre bei einer auf die aktuelle Blutzuckerbestimmung beschränkten Untersuchung als unauffällig eingestuft worden. Den Diabetiker mit 160 mg % Blutzucker und knapp 10 % HbA_1 kann man hinsichtlich seiner kurz- und langfristigen Einstellung wohl als grenzwertig einordnen. Die beiden Fälle mit Blutzuckerwerten über 200 mg % und HbA_1-Konzentrationen über 10 % sind kurz- und langfristig schlecht eingestellt.

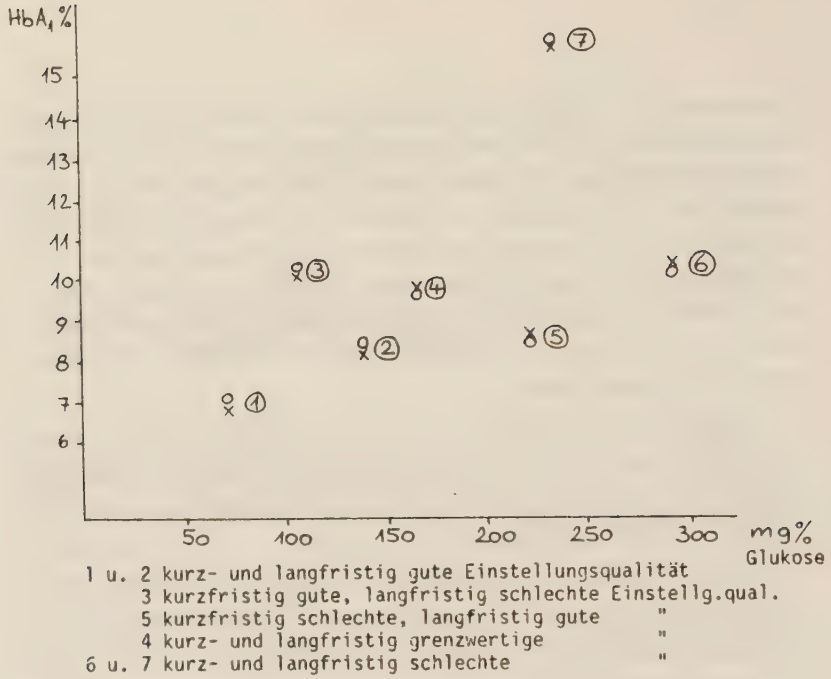


Abb. 13: Parallelbestimmung der HbA_1-Werte aus EDTA-Blut (o) und homogenisiertem (x) Vollblut von insulinpflichtigen Diabetikern bei jeweils bekannten Blutzuckerwerten.

Durch die nachträgliche Bestimmung des Gesamt-HbA_1 lassen sich also Anhaltspunkte für eine schlechte Diabeteseinstellung gewinnen. Dies ist z.B. bei der Beurteilung der Verkehrstauglichkeit von Zuckerkranken durchaus wichtig, da mit einer derartigen Trendaussage die Wahrscheinlichkeit einer Stoffwechselentgleisung erhärtet werden kann oder Erkenntnisse über eine Unfallursache gewonnen werden können.

Zusätzlich läßt sich das bewußte oder unbewußte Vortäuschen einer guten oder schlechten Stoffwechsellage bei Diabetikern - etwa bei Kontrolluntersuchungen zur allgemeinen Verkehrstauglichkeit nach Unfällen oder im Strafverfahren - durch Bestimmung des Gesamt-HbA_1 gut erfassen. Eine fal-

sche Einschätzung der Stoffwechsellage eines Diabetikers durch Urinsammelfehler oder aufgrund einer strikten Diätdisziplin kurz vor einer ambulanten behördlich angeordneten Kontrolle kann mit Hilfe des HbA_1-Wertes überprüft werden. Dies ist besonders für diabetiscne Kraftfahrer relevant, die zum Führen von Kraftfahrzeugen der Klasse 2 und zum Führen von Fahrzeugen zur Beförderung von Fahrgästen gemäß § 15d StVZO deshalb noch berechtigt sind, weil sie mit schwächer wirkenden Sulfonamidderivaten behandelt werden können und in der Regel nicht vermehrt zu Hypoglykamien neigen. Gleichzeitig ist diese Berechtigung nur aufrechtzuerhalten, wenn dieser Personenkreis sich einer regelmäßigen Stoffwechselkontrolle durch den Arzt im Abstand von höchstens 6 bis 8 Wochen unterzieht (55).

In der vom Bundesminister für Verkehr herausgegebenen "Schriftenreihe: Krankheit und Verkehr" (55) wird im Heft 57 (1979) auch noch auf einen in diesem Zusammenhang interessanten Gesichtspunkt hingewiesen: Bedeutungsvoll sei die Tatsache, daß nur etwa bei der Hälfte der an Diabetes mellitus Erkrankten die Krankheit bekannt ist. Es wurde geschätzt, daß etwa bei 1,5 % bis 2,0 % aller Bewohner der Bundesrepublik ein manifester Diabetes mellitus vorliege. Danach gäbe es rund 500 000 unbehandelte Diabetiker (bei 60 Millionen Einwohnern), von denen ein Teil als Kraftfahrer mit einigen Gefahren belastet sei, die sich aus dem nicht behandelten Leiden ergeben. Hier kann z.B. nach einem Verkehrsunfall die Bestimmung des Gesamt-HbA_1 nachträglich die Diagnose Diabetes mellitus bei entsprechendem Verdacht erstmalig ermöglichen.

3. Die Rolle der labilen Aldiminform für aktuelle Blutzucker-Schwankungen

Die Labilität der diabetischen Stoffwechsellage ist allerdings alleine aus der Gesamt-HbA_1-Messung nicht zu beurteilen. Sachse (73) wies nach, daß bei Diabetikern mit nahezu im Normbereich liegenden HbA_1-Werten eine labile Stoffwechsellage sehr wohl trotzdem bestehen könne. Dabei müsse aber die labile Aldiminform als Parameter für die Labilität einer diabetischen Stoffwechselsituation diskutiert werden, da sie sehr wohl mit akuten Blutzucker-Schwankungen korreliere (73).

Laube (54) geht in seiner Beurteilung der Aldiminform noch weiter, indem er behauptet, labile Stoffwechselverhältnisse könnten damit definiert werden und eine Fehleinschätzung sei dadurch zu vermeiden.

Sollte die Bedeutung der labilen Aldiminform für aktuelle Blutzuckerschwankungen durch weitere Untersuchungen gestützt werden, ergäbe sich in Verbindung mit der in dieser Arbeit angewendeten Homogenisierung der Blutproben eine Methode zum Nachweis von diabetischen Stoffwechselentgleisungen aus nicht verändertem oder vorbehandeltem Vollblut. Wie aus Arbeiten von Bottermann (9) und Niederau und Reinauer (57) hervorgeht, ist bisher die Aldiminform nur bei sehr hohen Blutzuckerschwankungen von über 3g/l meßbar, während geringe Prozentunterschiede unter Umständen in der Schwankungsbreite der Verfahren untergehen. Gleichwohl wäre dies für die rechtsmedizinische Gutachtertätigkeit von Vorteil, da in bestimmten Fragestellungen bei einem Unfallgeschehen etwa hohe Blutzuckerschwankungen für die Schuldfähigkeit durchaus in Betracht kommen.

4. Hypoglykämie und HbA_1-Bestimmung

Bisher läßt sich allerdings mit der HbA_1-Methode nur Aufschluß über hyperglykämische Zustandsbilder gewinnen. Da akute, unvermittelt auftretende Hypoglykämien in Straßenverkehrsdelikten z.B. sehr viel häufiger auftreten bzw. zumindest häufiger als Strafminderungstatbestand angeführt werden, wäre eine Methode zur Objektivierung einer hypoglykämischen Reaktion wünschenswert.

Laut Reinauer (69) seien Hypoglykämiezustände mit Hilfe des HbA_1 nicht diagnostizierbar. Jedenfalls seien bei Insulinomen keine signifikant verminderten HbA_1-Werte gegenüber Normalpersonen gefunden worden.

Sturner und Sullivan (88) hätten allerdings festgestellt, daß sich chronische Hypoglykämien durch HbA_1-Messung - verwendet worden sei die Thiobarbitursäure-Methode (TBA) - durchaus nachweisen ließen. Sturner beschreibt aber nur einen einzigen Fall und die Stichhaltigkeit läßt sich

zumindest anzweifeln, da die Messung erst nach fünf Monaten Lagerung im Kühlschrank aus dem Hämolysat erfolgt sei. Auf die bekannten, zwar minimalen Störungen der TBA-Methode durch die Hämolyse des Blutes verweist Sturner sogar selbst.

Gale (34) schildert einen Fall mit nächtlicher Hypoglykämie. Die Neigung eines 35-jährigen, seit zwölf Jahren insulinpflichtigen Diabetikers zu nächtlichen hypoglykämischen Reaktionen habe sich durch Bestimmung des HbA_1-Wertes aufdecken lassen: Es sei der für einen Diabetiker sehr niedrige HbA_1-Wert von 6,3 % gemessen worden, obwohl die Nachmittagswerte für Blutzucker eher erhöht gewesen seien und sogar regelmäßig eine Glucosurie von 2 % um 18 Uhr festgestellt worden sei. Der durch die HbA_1-Messung aufgekommene Verdacht habe durch ein Blutzucker-Übernachtprofil bestätigt werden können. Ursache sei eine zu hohe abendliche Insulindosis gewesen.

Es scheint also doch die Möglichkeit zu bestehen, eine Neigung zu hypoglykämischen Zuständen mit der HbA_1-Methode zu erfassen, so daß bei Verdacht eine HbA_1- Bestimmung als zusätzlicher Beurteilungsparameter gerechtfertigt erscheint. Besonders bei insulinpflichtigen Diabetikern könnte sich dies lohnen, da die allermeisten Hypoglykämien auf iatrogenen, exogenen Ursachen beruhen, wie eben einer relativen Insulinüberdosierung (65). Berger (6) gibt an, daß neun von zehn Fälle von Hypoglykämie auf diese Weise entstünden. Ganz allgemein kämen hypoglykämische Reaktionen bei insulinpflichtigen Diabetikern relativ häufig vor (36); relative Unterzuckerungszustände kämen in einer Studie von über 170 ambulant behandelten insulinbedürftigen Typ-I-Diabetikern in etwa 58 % pro Monat vor (36). Leichtere Hypoglykämien seien besonders bei Zuckerkranken zu beobachten, die Wert auf eine optimale Einstellung legten. Die sehr gute Einstellung dieses Personenkreises korreliere dann zumeist mit guten HbA_1-Werten (36). Außerdem könne es bei insulinbehandelten Diabetikern trotz konstanter Insulindosis, Muskelarbeit und Diät durch Begleitumstände wie beispielsweise Infekte, Niereninsuffizienz, Hypopnysen- oder Nebennierenrindeninsuffizienz, durch eine Verlängerung der Insulinhalbwertszeit oder einer Steigerung der Insulinsensivität der Zielorgane zu Hypoglykämien kommen (6).

Lohnen könnte sich eine Auswertung der HbA_1-Messung auch bei mit Insulinpumpen behandelten Diabetikern. Die Hypoglykämie bei der Behandlung mit einer Insulin-Infusionspumpe sei nach Wilms (98) deshalb so gefürchtet, weil, bedingt durch den langsamen Blutzuckerabfall als Folge der kontinuierlichen Insulin-Infusion, die Anzeichen und Warnzeichen einer Unterzuckerung vom Patienten weniger bemerkt und häufig nicht richtig eingeschätzt würden. Dies bestätigt auch Pfeiffer (64), der neben der Gefahr einer Hypoglykämie bei der Einstellung auf nahezu normale Blutzuckerwerte mit Hilfe der Insulinpumpe zusätzlich noch auf die erhöhte Zahl der Hyperglykämien hinweist. Diese seien durch das Fehlen des Depoteffektes der Verzögerungsinsuline bei einer Unterbrechung der Infusion durch verschiedene technische Mängel wie z.B. Katheterverstopfung oder Abknickung des Katheters zu erklären. Chronische insulinbedingte Hypoglymien ließen sich mit der HbA_1-Bestimmung möglicherweise erkennen. Gleichwohl wird man bei der retrospektiven Beurteilung von hypoglykämischen Zuständen oder einer Neigung zu Hypoglykämien durch die Bestimmung des HbA_1 noch weiter vorsichtig bleiben müssen. Das Erfassen einer Hypoglykämie gelingt mit der HbA_1-Messung wohl indirekt und wurde bisher noch nicht in ausreichend quantitativem Umfang beobachtet.

Eventuell ist auch im Zusammenhang mit einer akuten Hypoglykämie an eine weitere Untersuchung und Auswertung des labilen Anteils des HbA_1 (Aldiminform) mittels etwa des Aldimin-Eliminators zu denken.

5. Blutzucker- und HbA_1-Bestimmung aus gelagerten Blutproben

Das Problem der Lagerung und die Frage, wie lange nach der Blutentnahme eine Untersuchung noch aussagekräftig bleibt, ist sowohl für die Glucosebestimmung als auch für die HbA_1-Messung von großer Bedeutung.

Auch eine antikoagulierte und stabilisierte Blutprobe ist nur begrenzt für die Blutzuckerbestimmung verwertbar. Rick (70) gibt in seinem Lehrbuch für entsprechend vorbehandeltes Blut eine konstante Gluco-

sekonzentration innerhalb von zwölf Stunden bei Raumtemperatur und innerhalb von 48 Stunden bei +4°C an.

Schlebusch (76) spricht hierbei von einem wesentlich längeren Zeitintervall. Er habe nachgewiesen, daß sich die Glucosekonzentration in hämolysierten und stabilisierten Proben - gemessen mit der Hexokinase-Glucose-6-Phosphat-dehydrogenase-Methode - innerhalb von sieben Tagen nicht ändere.

Zu der Fragestellung der Abhängigkeit der HbA_1-Werte von der Lagerungszeit gibt es eine Untersuchung von Abraham et al.(1). Das HbA_1 sei hier als Gesamt-HbA_1 mit der Mikrosäulenmethode aus Hämolysat bestimmt worden und habe während der Lagerung bei +4°C im Kühlschrank innerhalb eines Monats keine signifikanten Veränderungen gezeigt. Man könne allenfalls von einer fallenden Tendenz der Werte zum Schluß der einmonatigen Aufbewahrung sprechen. Auf keinen Fall sei von einem Anstieg der HbA_1-Werte die Rede.

Zu eher gegenteiligen Ergebnissen kommt Szelényi (89) bei der Beobachtung der HbA_1-Werte über einen Zeitraum von drei Wochen. Verwendet worden seien auf die übliche Art konservierte (keine näheren Angaben) Blutproben. Dabei habe man eine erhöhte nicht-enzymatische Glykosylierung beobachten können. In der Arbeit wird allerdings darauf hingewiesen, daß - obwohl die Glykosylierung des Proteins dessen funktionelles und immunologisches Verhalten verändern könne - dieser Prozeß wahrscheinlich weniger stark bei der Lagerung in vitro als in vivo bei Diabetikern sei.

In dieser Arbeit wurde nun homogenisiertes Vollblut zur Bestimmung des HbA_1 verwendet und über 14 Tage hin ausgewertet. Dabei konnte eine Konstanz der Werte innerhalb dieses Zeitraums beobachtet werden. Zumindest bei Normoglykämikern kann von dieser Beständigkeit der Werte eben auch in Vollblutproben ausgegangen werden.

Die von Szélenyi angesprochene Möglichkeit einer erhöhten Glykosylierung bei der Lagerung von Diabetikerblut konnte zumindest in einem Fall bestätigt werden. Diese Aussage bedürfte aber einer Stützung durch weitere Messungen. Im Institut für Rechtsmedizin standen dafür Blutproben von Diabetikern nicht in ausreichendem Maße zur Verfügung.

6. HbA_1 und Alkohol

Im letzten Teil dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß zwischen einem bestimmten Blutalkoholspiegel und dem gemessenen HbA_1-Wert keine Abhängigkeit besteht. Dies konnte in homogenisiertem Vollblut von Normalpersonen als auch von Diabetikern gezeigt werden. Da der Einfluß von Alkohol auf die Blutglucosekonzentration komplexer Art ist, soll darauf noch kurz eingegangen werden.

Kallas (49) spricht in diesem Zusammenhang von dem sog. "Zwei-Phasen-Effekt" von Äthanol. Nach Zufuhr von Äthanol (50 - 150 ml) lasse sich innerhalb von 30 - 60 Minuten sowohl bei Nicht-Alkoholikern als auch bei chronisch Alkoholabhängigen in allerdings ausreichendem Ernährungszustand ein Anstieg der Blutzucker-Konzentration messen. Dies spiegele die anfängliche Stimulation der Glykogenolyse bei suffizientem Glykogenspeicher aus der Leber durch Alkohol wider. Das Ganze erhalte noch einen zusätzlichen synergistischen Effekt durch die gleichzeitig erfolgende Hemmung der peripheren Verwertung der Glucose, mitbedingt ebenfalls durch die Wirkung von Alkohol. Bei Alkoholikern mit chronischer Lebererkrankung dürfte für die Pathogenese der Glucoseutilisationsstörung zusätzlich die beschriebene Insulinresistenz bei chronischen Leberleiden eine Rolle spielen (59). Über die Bedeutung der erhöhten Konzentrationen freier Fettsäuren für die gestörte periphere Glucoseverwertung wird noch diskutiert (59). Über den Zeitpunkt, wann dieser zusätzliche Faktor der peripheren Verwertungsstörung der Glucose eintrete, bestent jedoch noch keine Einigkeit.

Searle (83) beobachtete sogar anfänglich eine Steigerung der Glucoseverwertung und erst später - zu einer Zeit, die in die sog. "Zweite Phase" der Alkoholwirkung fallen würde - die von Kallas beschriebene Hemmung.

In der meist nach 6 bis 36 Stunden eintretenden "Zweiten Phase" komme es dann eben zu der mehrfach beschriebenen Periode einer Hypoglykämie (4,22,30,44,48,49,83). Dabei wird allgemein angenommen, daß diese alkohol-

bedingte Hypoglykämie vorwiegend auf eine Hemmung der Gluconeogenese durch Alkohol zurückzuführen sei. Dies sei laut Högberg (44) schon durch 1 mM (= 0,5 %) Äthanol gegeben.

Nach Searle (83) müßten aber noch andere Faktoren an der Entstehung der Hypoglykämie beteiligt sein. So kann z.B. längerfristiges Fasten die Glykogenreserven der Leber drastisch reduzieren, wobei eine akute Alkoholgabe die Reserven noch weiter verringert und das Auftreten einer Hypoglykämie zu fördern vermag. Im Falle der Beurteilung einer Hypoglykämie in Zusammenhang mit einer Alkoholvergiftung bei Kleinkindern (z.B. auf Grund von Ingestion äthanolhaltiger Reinigungsmittel) ist dabei noch auf die grundsätzlich niedrigen Glykogenspeicher in diesem Alter hinzuweisen (44).

Von besonderem Interesse scheinen alkoholbedingte Veränderungen des Redoxzustandes zu sein (91). So habe die alkoholbedingte Hypoglykämie durch 4-Methylpyrazol, einem Hemmstoff der Alkoholdehydrogenase verhindert werden können, was auf eine wesentliche Rolle des Alkohol-Stoffwechsels bei der Pathogenese der alkoholbedingten Hypoglykämie hinweise.

Wenngleich auch die pathogenetischen Hintergründe des Einflusses von Alkohol auf den Glucosestoffwechsel noch nicht in der Gesamtheit geklärt sind, so besteht immerhin doch Einigkeit über die anfängliche, kurzdauernde hyperglykämische und die nachfolgende langerdauernde hypoglykämische Reaktion des Organismus auf Alkohol.

Die Tatsache, daß akute Hypoglykämien bei Alkoholikern relativ selten sind, wird weitgehend damit begründet, daß Alkoholiker im Durchschnitt doch in einem recht guten Ernährungszustand seien, zumindest, was die in der Klinik beobachteten Fälle betreffe. Gleichzeitig könne durch die periphere Verwertungsstörung von Glucose durch Alkohol, bei chronischen Leberleiden auch zusätzlich noch durch die eventuell bestehende Insulinresistenz, ein Blutzuckeranstieg erfolgen und damit eine Hypoglykämie gleichsam verhindert werden (49,83). Drost (22) führt dazu noch den relativ hohen Kohlenhydratanteil von Alkoholika in diese Argumentation mit ein.

In verschiedenen Arbeiten ist nun versucht worden, herauszufinden, inwieweit sich mit Hilfe der Bestimmung des HbA_1 eine Aussage über die Glucosestoffwechsellage bei vermutlich chronischen Alkoholikern bzw. periodisch exzessiven Trinkern machen läßt.

Dabei wäre an eher niedrige HbA_1-Werte zu denken gewesen, geht man von der zwar seltenen, aber beschriebenen Möglichkeit von hypoglykämischen Zuständen bei Alkoholmißbrauch aus. Diabetiker und Personen mit gestörter Glucosetoleranz wären auszuklammern, obwohl gerade dies schwierig ist: Denn gerade bei chronischen Lebererkrankungen, mit denen im Falle der Alkoholiker zumindest zu rechnen ist, nimmt die Häufung dieser Krankheiten zu (91).

Im Gegenteil aber haben Stevens et al. (87) abnorm erhöhte HbA_1-Fraktionen bei Alkoholikern gefunden. Er habe dies einer irreversiblen Anlagerung von Acetaldehyd an Hämoglobin zugeschrieben, da modifizierte Hämoglobine mit der HbA_1-Fraktion gewandert seien, sobald gereinigtes Hämoglobin mit Acetaldehyd inkubiert worden sei.

Hobermann (43) habe in einer ersten Studie ebenfalls nach Inkubation von radioaktiv markiertem Acetaldehyd mit Erythrozyten glykosylierte Hämoglobine chromatographisch darstellen können, die mit HbA_{1a+b}, nicht mit HbA_{1c} gewandert seien. Tsuboi et al. (93) habe von ähnlichen Ergebnissen berichtet.

Bei einem Vergleich von normoglykämischen Alkoholikern mit einem freiwilligen gesunden Vergleichskollektiv ist Hobermann 1982 (43) dann zu etwas anderen Resultaten gekommen. Bei beiden Gruppen seien sowohl die Gesamt-HbA_1-Fraktion mit Makrosäulenmethode nach Abraham und Trivelli bestimmt worden - diese erlaubt eine Differenzierung von HbA_{1a+b} und HbA_{1c} - als auch das HbA_{1c} isoliert mit der Thiobarbitursaure-Methode (TBA) nach Flückiger und Winterhalter. Dabei sei die Gesamt-HbA_1-Fraktion der Alkoholiker gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöht gewesen. Hobermann vermutete ein alkoholspezifisches Hämoglobin, das diesmal mit der HbA_{1c}-Fraktion gewandert, dessen Trennung von HbA_{1c} aber nicht gelungen sei. In der viermal so kurzen Halbwertzeit dieses alkoholspezifischen Hämoglobins im Vergleich zu der von HbA_1 findet Hoberman eine Erklärung dafür, daß episodisches, exzessives Trinken im Gegensatz zu chronischem

Trinken nicht zu einer signifikanten Erhöhung des HbA_1 führe. Allerdings sei auch die Möglichkeit bei Alkoholikern denkbar, dieses alkoholbedingte Hämoglobin mangelhaft zu bilden. Vom Grad der Leberschädigung sei eine Erhöhung des HbA_1 nicht abhängig gewesen. Dies überrascht, da Ohlen (59) z.B. berichtet, daß trotz Hyperinsulinismus die Blutzuckerkonzentration beim chronisch Leberkranken sowohl in nüchternem Zustand als auch nach Glucosezufuhr deutlich erhöht sei.

Diese letzten Studien von Hobermann bieten einen möglichen Erklärungsversuch dafür an, daß die von uns bestimmten HbA_1-Werte keine Korrelation mit den BAK-Werten zeigten: Bei den am Trinkversuch beteiligten Personen ließ sich chronischer Alkoholismus ausschließen und bei den asservierten Blutproben von Normoglykämikern als auch von Diabetikern war chronisches Trinken von Alkohol nicht eindeutig feststellbar. In allen Fällen läßt sich also lediglich von periodischem Trinken sprechen. Insofern würde das in dieser Arbeit erhaltene Ergebnis sich mit der Aussage von Hobermann decken, daß (exzessives) periodisches Trinken nicht zu einer Erhöhung des HbA_1 führe.

F. Zusammenfassung

1. Die Mikrosäulenmethode ist auch ohne Antikoagulierung von Blutproben mit EDTA nach Homogenisieren des Vollblutes (=modifizierte Mikrosäulen-Methode) anwendbar. Dies konnte in mehreren Zehnfachbestimmungen mit Eigenbluten nachgewiesen werden. Dies bedeutet, daß für rechtsmedizinische Gesichtspunkte die Möglichkeit einer nachträglichen Untersuchung von asservierten, nicht chemisch vorbehandelten Vollblutproben auf den Gesamt-HbA_1-Gehalt mit der Mikrosäulen-Chromatographie besteht. Damit ergibt sich eine indirekte, retrospektive Langzeitaussage (4-6 Wochen) über die Blutzuckermittellage.

2. Ein Vergleich der HbA_1-Bestimmung aus EDTA-Blut und homogenisiertem Vollblut von sieben insulinpflichtigen Diabetikern zeigte, daß die modifizierte Mikrosäulen-Methode auch in diesem Falle aussagekräftig bleibt.

3. Die HbA_1-Werte aus homogenisiertem Vollblut bleiben bei bis zu mehr als 14-tägiger Lagerung bei 4°C konstant.

4. Eine Abhängigkeit des mit dieser Methode gemessenen HbA_1-Spiegels in 15 Fällen mit erhöhter Blutalkohol-Konzentration (=BAK) zeichnete sich nicht ab.

5. Für 11 Diabetiker mit teilweise erhöhtem HbA_1 und somit schlechter vorausgegangener Stoffwechsellage ließ sich ebenfalls keine Korrelation zwischen HbA_1 und erhöhter Blutalkohol-Konzentration nachweisen.

6. Durch die - auch nachträglich mögliche - HbA_1-Bestimmung aus Vollblutproben ergibt sich die Möglichkeit einer retrospektiven Beurteilung der Blutzuckermittellage über wenige Wochen vor einem Ereignis bzw. einer Blutentnahme. Bei Diabetikern läßt sich hierdurch objektiv die Qualität der Stoffwechseleinstellung über die letzten 4 bis 6 Wochen vor einem Vorfall beurteilen.

Insbesondere bei - häufig - fehlenden aktuellen Blutzuckerwerten kann die HbA_1-Bestimmung wertvolle Beurteilungs-Kriterien liefern, z.B. im Hinblick auf hyperglykämiebedingte Bewußtseinsstörungen als Unfallursache, mangelnde Sorgfalt und Zuverlässigkeit diabetischer Kraftfahrer bei der Diabeteseinstellung oder Vortäuschen einer guten Stoffwechsellage bei ambulanter Kontrolle durch kurzfristige Diätdisziplin.

G. Literaturverzeichnis

1. Abraham, E.C. et al.: Determination of Glycosylated Hemoglobins (HbA_1) with a new microcolumn Procedure, in: Diabetes, 27(9): 931-937,1978.

2. Allen, D.W., Schroeder, W.A., Balog, J.: Observations on the chromatographic heterogeneity of normal adult and fetal human hemoglobin: a study of the effects of crystallization and chromatography on the heterogeneity and isoleucin content, in: J.Am. Chem. Soc.80:1628-1634, 1958.

3. Angrick, M., Rewicki, D., Die Maillard Reaktion,in: Chemie in unserer Zeit, 14(5):149-157, 1980.

4. Arky, R.A., Freinkel, N.: Alcohol hypoglycemia: Venal alcohol infusion to test gluconeogenesis in starvation, with special reference to obesity, in: N.Engl. J. Med.274:426, 1966.

5. Bachem, M.G., Paschen, K., Strobel, B., Jastram, H.K., Janssen, E.G., Dati, F.: Beziehungen zwischen Lipidstoffwechsel und glykosylierten Hämoglobinen beim juvenilen Diabetes mellitus, in: Klin. Wochenschr. 60:497-503, 1982.

6. Berger, M., Tsotsalas, M.: Diagnostik der Hypoglykämie im Erwachsenenalter, in: Dtsch.Med. Wschr.108:1065-1070, 1982.

7. Bolli, G., Compagnucci, P., Cartechini, M.G., Panara, G., Brunetti,P. Effect of insulin treatment on glycosylated hemoglobin levels in diabetes mellitus, in: JRCS Med.Sci.6:366, 1978.

8. Bottermann, P., Gain, Th.: Glykosylierte Hämoglobine und Diabeteskontrolle, in: Med.Welt 33:329-333, 1982.

9. Bottermann, P., Gain, Th., Tuphorn, J.: Korrelation zwischen HbA_1-Konzentration und der zurückliegenden Blutzuckermittellage, Kurzberichte über Tagung "HbA_1 und glykosylierte Proteine", in: Das Ärztl. Laboratorium 10:25, 1983.

10. Bottermann, P.: Nichtenzymatische Glykosylierung von Hämoglobin, Kurzber. über Tagung "HbA_1 und glykosylierte Proteine", in: Das Ärztl. Laborat.10:18, 1983.

11. Broer de, J., Miedema, K., Casparie, A.F.: Glycosylated hemoglobin in renal failure, in: Diabetologia 18:437-440, 1980.

12. Bunn, H.F., Haney, D.N., Gabbay, K.H., Gallop, P.M.: Further identification of the nature of the carbonhydrate in hemoglobin A_{1c}, in: Biochem. biophys. Res. Commun. 67:103-109, 1975.

13. Bunn, H.F., Haney, D.N., Kansin, S., Gabbay, K.H., Gallop, P.M.: The biosynthesis of human hemoglobin A_{1c}. Slow glycosylation of hemoglobin in vivo, in: J.Clin.Invest.57:1652-1659, 1976.

14. Bunn, H.F., Gabbay, K.H., Gallop, P.M.: The glycosylation of hemoglobin: relevance to diabetes mellitus, in: Science 20:21-27, 1978.

15. Bunn, H.F.: Evaluation of glycosylated hemoglobin in diabetic patients, in: Diabetes 30:613-617, 1981.

16. Clegg, M.D., Schroeder, W.A.: The relation between the minor components of normal adult human hemoglobin including a comparison of hemoglobin from normal and phenylketonuric individuals, in: J.Amer.Chem.Soc.81:6065-6096, 1959.

17. Coe, J.J.: Peripheral blood glucose and cardiopulmonary resuscitation, in: Forensic Science Gazette 6(4):1, 1975.

18. Cole, R.A., Soeldner, J.S., Dunn, P.J., Bunn, H.F.: A rapid method for the determination of glykosylated hemoglobins using high pressure liquid chromatography, in: Metabolism 27:289-301, 1978.

19. Davis, J.E., McDonald, J.M., Jarett, L.: A high-performance liquid chromatography method for hemoglobin A_{1c}, in: Diabetes 27:102-107, 1978.

20. Dix, D., Cohen, P., Kingsley, S., Lea, M.J., Senkbeil, J., Sexton, K.: Interference by latescence in glycohemoglobin analysis, in: Clin. Chem.25(3):494-495, 1979.

21. Drost, H., Jahnke, K.: Möglichkeiten der Diätbehandlung bei Diabetes mellitus, in: Dtsch. Ärztebl.23:39-47, (1982).

22. Dunn, P.J., Cole, R.A., Soeldner, J.S., Gleason, R.E., Kwa, E., Kiroozabaldi, H., Younger, D., Graham, C.A.: Temporal relatinships of glycosylated hemoglobin concentrations to glucose control in diabetics, in: Diabetologia 17:213-220, 1979.

23. Evans, W.E.D., in: Charles C. Thomas ed.: The chemistry of death, Springfield, JL 27, 1963.

24. Fischer, R.W., DeJong, C., Voigt, E., Berger, W., Winterhalter, K.H: The colorimetric determination of HbA_{1c} in normal and diabetic subjects, in: Clin.Lab.Haemat. 2:129-138, 1980.

25. Fischer, R.W.: Kurzber. der Tagung "HbA_1 und glykosylierte Proteine", Nichtenzymatische Glykosylierung von Kollagen, in: Das Ärztl. Laboratorium 10:18, 1983.

26. Fitzgibbons, J.F., Koler, R.D., Jones, R.T.: Red cell agerated changes of HbA_{1a+b} and HbA_{1c} in normal and diabetic subjects, in: J.Clin.invest.58:820-824, 1976.

28. Flückiger, R., Winterhalter, K.H.: In vitro synthesis of hemoglobin A_{1c}, in: Febs. Letters 71: 356-360, 1976.

29. Fraser, D.M., Smith, A.F., Gray, R.S.: Glycosylated hemoblobin concentrations in newly diagnosed diabetics before and during treatment, in: Brit.Med.J.1:979, 1979.

30. Freinkel, N., Cohen, A.K., Foster, A.E., Arky, R.A.: Alcohol hypoglycaemia II. A postulated mechanism of action based on experiments with liver slices, in: J. Clin. Endocrinol. Metab. 25:76 (1965).

31. Gabbay, K.H., Hastry,K., Breslow, J.L., Ellison, R.C., Bunn, H.F., Gallop, P.M.: Glycosylated hemoglobin and longterm blood glucose control in diabetes mellitus, in: J.Clin.Endocrinol.Metab.44:859, 1977.

32. Gabbay, K.H.: Glycosylated hemoglobins and diabetes mellitus, in: Med.Clin.N.Amer.66:1309-1315, 1982.

33. Gain, Th., Henderkoff, U., Gyaram, H., Bottermann,P.:Untersuchung zur Bildung und Elimination der Aldimin-Form, Kurzberichte über die Tagung "HbA_1 und glykosylierte Proteine" in: Das Ärztl. Laboratorium 10:22, 1983.

34. Gale, E.A.M., Walford, S., Tattersall, R.B.: Nocturnal hypoglycaemia and HbA_1, in: the Lancet 8:1240-1241, 1979.

35. Goebel, F.D., Füeßl, H.S.: Klinische Relevanz der Aldimin-Form der glykosylierten Hämoglobine bei raschen Blutzuckerschwankungen - Kurzber. über die Tagung "HbA_1 und glykosylierte Proteine", in: Das Ärztl. Lab.10:23, 1983.

36. Goldgewicht, C., Slama, G., Papoz, L., Tschobroutsky: Hypoglycaemic reactions in 172 type I (insulin-dependent) diabetic patients, in: Diabetologia 24:95-99, 1983.

37. Goldstein, D.E., Parker, K.M., England, J.D., England, J.D.jr., Wiedmeyer, H.M., Rawlings, S.S., Hess, R., Little, R.R., Simonds,J.F., Breytogle, R.P.: Clinical application of glycosylated hemoglobin-measurements, in: Diabetes (Supplem.) 31:70-78, 1982.

38. Gonen, B., Rubenstein, A.H., Rochman, H. et al: Hemoglobin A_1: An indicator of the metabolic control of diabetic patients, in: The Lancet 2:734-737, 1977.

39. Graf, R.J., Porte, D.: Glycosylated hemoglobin as an index of glycemia independent of plasma insulin in normal and diabetic subjects, in: Diabetes 26:368, 1977.

40. Heinze, E., Vetter, U., Thon, A., Kohne, E.: Die"risikolose" HbA_1-Konzentration für den Typ-I-Diabetiker, in: Dtsch.Med.Wschr.108(43): 1632-1634, 1983.

41. Henrichs, H.R.: Indikationen und therapeutische Konsequenz der HbA_1-Bestimmung, Kurzber. über die Tagung "HbA_1 und glykosylierte Proteine" in: Das Ärztl.Lab.10:27, 1983.

42. Hoberman, H.D.,: A possible hemoglobin marker of alcoholism, in: R. Thurman (ed.), Alcohol and aldehyd metabolizing systems, N.Y., Plenum 3:265, 1980.

43. Hoberman, H.D., Chiodo, S.M.: Elevation of the hemoglobin A_1-fraction in alcoholism. in: Alcoholism: Clinical and experimental research 6 (2):260-267, 1982.

44. Högberg, J., Rajs, J.: Sudden unexpected child death associated with ingestion of fluid dish detergent, in: Rechtsmedizin 89:51-55, 1982.

45. Horstkotte, E., Otto,J., Niklas, L., Otto, H.: Stellenwert der HbA_1-Bestimmung in der Diagnose des manifesten Diabetes mellitus, Kurzber. über die Tagung "HbA_1 und glykosylierte Proteine", in: Das Ärztl. Lab. 10:24-25, 1983.

46. Huisman, T.H., Dozy, Dee, Beaky, Mick, Tich: Studies on the heterogeneity with oxidized glutathione, in: J.Lab.Clin.Med.60:302-319, 1962.

47. Javid, J., Pettis, P.K., Koenig, R.J., Cerami,A.:Immunologic characterization and quantification of hemoglobin A_{1c}, in: Brit.J.Haemat.38:329-337, 1978.

48. Jenner, B.M., Neal, B.W.: Alcohol-induced hypoglycaemia, in: Med.J. Austr.63(II):79-80 (1979).

49. Kallas, P., Sellers, E.M.: Blood glucose in intoxicated chronic alcoholics, in: Can. Med. Assoc. J. 112:590-592, (1975).

50. Koenig, R.J., Cerami, A.: Synthesis of hemoglobin A_{1c} in normal and diabetic mice: Potential model of basement membrane thickening, in: Proc. Nat. Acad. Sci. 72:3687-3671, 1975.

51. Koenig, R.J., Peterson, C.M., Jones, R.C., Saudeck, C., Lehrmann, M., Cerami, A.: Correlation of glucose regulation and HbA_1 in diabetes mellitus, in: N. Engl. J., Med. 295:417-420, 1976.

52. Krönert, K.: HbA_1, ein neuer Parameter zur Kontrolle der Stoffwechseleinstellung beim Diabetes mellitus, in: Das Ärztl. Lab. 30: 15-18, 1984.

53. Kynoch, R.A.M., Lehmann, H.: Rapid estimation (2 1/2 hours) of glycosylated hemoglobin for routine purposes, in: The Lancet 2:16-18, 1977.

54. Laube, H., Küppers, B.: Unterschiedliche Kohlenhydratanteile in der Diabetes-Diät: Einfluß auf die labile und stabile Form des HbA_1, Kurzber. zur Tagung "HbA_1 und glykosylierte Proteine", in: Das Ärztl. Lab. 10:23-24, 1983.

55. Lewrenz, H., Friedel B., Ed. Bundesminister für Verkehr: Zuckerkrankheit, Schriftenreihe Krankheit und Verkehr 57:23-25, 1979.

56. Menard, L., Dempsey, M.E., Blankstein, L.A., Aleyassine, M., Wacks, M., Soeldner, J.S.: Quantitative determination of glycosylated hemoglobin A_1 by agar gel electrophoresis, in: Clin. Chem. 26: 1598-1602, 1980.

57. Niederau, C.M., Reinauer, H.: Analyseverfahren für glykosydierte Hämoglobine. Ein Methodenvergleich, in: J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 19:1097-1101, 1981.

58. Niederau, C.M., Reinauer, H.: Kurzberichte über die Tagung "HbA_1 und glykosylierte Proteine" in: Das Ärztliche Laboratorium 10 : 28, 1983.

59. Ohlen, J.H., Selmaier, H.: Lebererkrankungen und Diabetes mellitus, in: Dtsch. Ärzteblatt 81:1179-1182, 1984.

60. Panchem ^{R} (Gesellschaft für chemische Produkte mbH), Blätter zur Arbeitsanleitung mit der Mikrosäulenmethode: "Beseitigung der labilen Aldiminform in glykosydierten Hämoglobinen."

61. Panzer, S., Graninger, W., Kronik, G., Bettelheim, P., Lechner, K.: Glycosylated hemoglobin as a longterm parameter in appraising the severity of hemolytic desease, in: Klin. Wschr. 61:839-843, 1983.

62. Paulsen, E.P.: Hemoglobin A_{1c}, in: Childhood Desease Metabolism 22: 269-271, 1973.

63. Perutz, M.F., Sanders, J.K.M., Chenery, D.H., Noble, R.W., Pennely, R.R., Fung, L.W.-M., Ho, C., Giannini, J., Pörschke, D., Winkler, H.: Interactions between the quarternary structure of the globin and the spin state of the heme in ferric mixed spin derivates of hemoglobin, in: Biochem. 17:3640-3652, 1978.

64. Pfeiffer, E.F., Kerner, W.: Diabetestherapie: künstliches endokrines Pankreas und tragbare Insulinpumpen, in: Dtsch. Ärztebl. 81(47): 3495-3413.

65. Potter, J., Clarke, P., Gale, E.A.M., Dave, S.H., Tattersall, R.B.: Insulin-induced hypoglycemia in accident and emergency department: The tip of an iceberg, in: Brit. Med. J. 285:1180, 1982.

66. Rahbar, S.: An abnormal hemoglobin in red cells of diabetics, in: Clin. Chim. Acta 22:296-298, 1968.

67. Rahbar, S., Blumenfeld, O., Ranney, H.M.: Studies of an unusual hemoglobin in patients with diabetes mellitus, in: Biochem.biophys. Res. Commun. 36:838-843, 1969.

68. Reinauer, H., Niederau, C.M.: Chemische Grundlagen der Bildung und Beseitigung der Aldimin-Form, Kurzber. über die Tagung "HbA_1 und glykosylierte Proteine", in: Das Ärztl. Lab. 10:22, 1983.

69. Reinauer, H.: Persönliche Mitteilung in einem Brief an Prof. Spann vom 5. 11. 81.

70. Rick, W.: Blutentnahmebedingungen zur Glucosebestimmung, in: Klin. Chem. u. Mikroskopie, Springer, Berlin, Heidelberg, N.Y.:177,1977.

71. Rick, W.: Bestimmung der Glucosekonzentration, in: Klin. Chem. u. Mikroskopie, Springer, Berlin, Heidelberg, New York:177, 1977.

72. Ritchey, J.M., Tam, J.W.O., Klotz, J.M.: Binding of glucose by hemoglobin, in: S. Fed. Proc., Am. Soc. Exp. Biol. 33:1451, 1974.

73. Sachse, G.: Kommt der Aldimin-Form eine diagnostische und/oder prognostische Wertigkeit zu?, Kurzber. über die Tagung "HbA_1 und glykosylierte Proteine", in: Das Ärztl. Lab. 10:24, 1983.

74. Saddi, R., Wajcman, H., Eschwege, E., Levy, R., Duchateau, A.: Glycosylated hemoglobin in patients on venesection therapy for haemochromatosis, in: The Lancet 1:141-142, 1980.

75. Schernthaner, G.: Glykohämoglobin (HbA_1): Ein wertvoller Parameter zur Beurteilung der Diabetes-Langzeitkontrolle, in: Dtsch. Med. Wschr. 107:1099-1101, 1982.

76. Schlebusch, H., Sorger, M., Munz, E., Kessler, A.-Ch., Zwerz, W.: Glucosebestimmung in hämolysierten Blutproben, in: J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 18:885-891, 1980.

77. Schleicher, E., Wieland, O.H.: Specific quantitations by HPLC of protein (lysin) bound glucose in human serum albumin and other glycosylated proteins, in: J. Clin. Chem., Clin. Biochem. 19:81-87, 1981.

78. Schleicher, E., Wieland, O.H.: Nichtenzymatische Glykosylierung von Proteinen, Kurzber. über die Tagung "HbA_1 und glykosylierte Proteine", in: Das Ärztl. Lab. 10:20, 1983.

79. Schmidt, R.F., Thews, G.: Physiologie des Menschen, Springer, Berlin Heidelberg, New York:334-335, 1977.

80. Schnek, A.G., Schroeder, W.A.: The relation between the minor components of whole normal human adult hemoglobin as isolated by chromatography and starch block electrophorensis, in: J. Am. Chem. Soc., 83:1472-1478, 1961.

81. Schnider, S.L., Kohn, R.R.: Effects of age and diabetes mellitus on the solution and nonenzymatic glucosylation of human skin collagen, in: J. Clin. Invest. 67:1630-1635, 1981.

82. Schuyler, M.R., Niewöhner, D.E., Inkley, S.R., Kohn, R.R.: Abnormal lung elasticity in juvenile diabetes mellitus, in: Am. Rev. Respir. Dis. 113:37-41, 1976.

83. Searle, G.L., Shames, D., et al: Evaluation of ethanol hypoglycaemia in man: Turnover studies with C-6 ^{14}C Glucose, in: Metabolism 23 (11):1023-1035, 1974.

84. Sippel, H., Möttönen, M.: Combined glucose and lactate values in vitreous humour for postmortem diagnosis of diabetes mellitus, in Forens. Sci. Intern. 19:217-222,1982.

85. Sonnenberg. G.E., Eichholz, U., Chantelau, E., Berger, M.: Welche Bestimmungsmethode des HbA_1 ist für die Langzeitkontrolle des Diabetes geeignet, in: Med. Welt 32(32/33):1212-1213, 1981.

86. Sorger, M., Schlebusch, H.: Methodenvergleich und Qualitätskontrolle bei der Bestimmung glykosylierter Hämoglobine, Kurzber. über die Tagung "HbA_1 und glykosylierte Hämoglobine", in: Das Ärztl. Labor. 10:20, 1983.

87. Stevens, V.J., Fantl, W.J., Newman, C.B., Sims, R.V., Cerami, A., Petersen, C.M.: Acetaldehyd adducts with hemoglobin, in: J. Clin. Invest. 67:362-369, 1981.

88. Sturner, W.Q., Sullivan, A.: Hypoglycaemia as the responsible factor in a truck driver accident fatality, in: J. Forensic Sci. 28: 1016-1020, 1983.

89. Szelényi, J.G., Földi, J., Hollau, S.R.: Erhöhte nicht enzymatische Glykosylierung des Blutproteins während der Blutlagerung, Kurzber. über die Tagung "HbA_1 und glykosylierte Proteine", in: Das Ärztl. Lab. 10:19, 1983.

90. Tattersall, R.B., Pyke, D.A., Ranney, H.M., Bruckheimer, S.M.: Hemoglobin components in diabetes mellitus: Studies in identical twins, in: New Engl. J. Med. 293:1171-1173, 1975.

91. Teschke, R., Lieber, C.S.(Ed.): Alkohol und Organschäden, Witzstock, Baden-Baden:89, 1981.

92. Trivelli, L.A., Rauney, H.M., Lai, H.T.: Hemoglobin components in patients with diabetes mellitus, in: New Engl. J. Med. 284: 353-357, 1971.

93. Tsuboi, K.K., Thompson, D.J., Rush, E.M., Schwarz, H.: Acetaldehyd-dependent changes in hemoglobin and oxygen affinity in human erythrozytes, in: Hemoglobin 5:241-250, 1981.

94. Uitto, J., Grant, G.A., Perejda, A.J., Rowold, E., Williamson, J.R.: Glucosylation of human glomerular basement membrane collagen (GBMC): increased non-enzymatic glucosylation in diabetes, in: Fed. Proc. Abstract. 39:1972, 1980.

95. Vlassera, H., Brownlee, M., Cerami, A.: Nonenzymatic glycosylation of peripheral nerve protein in diabetes mellitus, in: Proc. Nat. Acad. Sci. USA 78:5190-5192, 1981.

96. Vogt, B.W., Schleicher, E.D., Wieland, O.H.: E-amino-lysine-bound glucose in human tissues obtained at autopsy. Incease in diabetes mellitus, in: Diabetes 31(12):1123-1127, 1982.

97. Welch, S.G., Boucher, B.J.: A rapid microscale method for the measurement of hemoglobin A_1(a+b+c), in: Diabetologia 14:209, 1978.

98. Wilms, B., Arends, J.: Erhöhte Sterblichkeit bei Behandlung mit tragbaren Insulin-Infusionspumpen, in: Dtsch. Med. Wschr. 109 (19):768-769, 1984.

L E B E N S L A U F

Ottmar K ö g l e r

25.10.1952	Geboren in Riedenburg/Altmühltal als Sohn des Beamten Egon Kögler und dessen Ehefrau Elisabeth Kögler, geborene Schels
	Bekenntnis: römisch-katholisch
	Schulbildung:
1959-1964	Volksschule in Riedenburg
1964-1973	Math.-naturwiss. Gymnasium Kelheim/Donau
1973	Abitur in Kelheim
	Wehr-/Zivildienst:
Juli 1973 - März 1974	Wehrdienst in Idar-Oberstein und Regensburg
März 1974 - Okt. 1974	Zivildienst in der Jugendherberge Kelheim
	Studium:
Nov. 1974 - März 1976	Architekturstudium, TU München
März 1976 - April 1977	Arbeit als Krankenpflegehelfer in der Diakonissenanstalt München, Heßstraße
April 1977 - April 1978	Krankenpflegehelfer im Neurologischen Krankenhaus Tristanstraße, München
Mai 1978 - Mai 1984	Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität in München
Mai 1984	3. Staatsexamen in München
Juni 1984	Erhalt der Approbation
	Berufliche Tätigkeit:
Sept. 1984	Assistenzarzt am Institut für Anästhesiologie der Ludwig-Maximilians-Universität in München, Poliklinik, Leiter: Prof. Dr. A. Doenicke